

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Speciální chemicko-biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



**Klára Ničová**

Rostlinný tubulinový kód  
Plant tubulin code

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Praha, 2020

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala své školitelce Kateřině Schwarzerové za ochotu, pečlivost a podnětné připomínky.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne, 4.6.2020

Podpis:

## Abstrakt

Mikrotubuly, které jsou tvořeny polymery  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulinu, jsou základní složkou cytoskeletu. Oba typy tubulinů vykazují napříč eukaryotickými organismy značnou sekvenční homologii. Tubuliny jsou kódovány poměrně rozsáhlými genovými rodinami, obzvláště u mnohobuněčných organismů. Expresí těchto genů vznikají tubulinové izotypy, které mohou vykazovat odlišné vlastnosti. Jednotlivé izotypy mohou být dále posttranslačně modifikovány. Mezi nejznámější posttranslační modifikace tubulinu patří acetylace, fosforylace, tyrozinace, polyglutamylace a polyglycylylace. Díky kombinaci exprese různých tubulinových izotypů a jejich různých posttranslačních modifikací vzniká v buňkách „směs“ heterogenních tubulinů, které mohou vykazovat odlišné vlastnosti a vykonávat různé funkce. Tento jev nazýváme tubulinový kód. Ačkoliv byla existence tubulinového kódu prokázána u většiny modelových organismů včetně rostlin, pochopení přesného významu zabudování různých tubulinu do mikrotubulů je stále předmětem výzkumu. Velká část výzkumu tubulinového kódu byla provedena na živočišných modelech. Oproti tomu v rostlinách se toho o významu tubulinového kódu ví relativně málo. Tato práce shrnuje současné poznatky o výskytu a funkci tubulinových izotypů a jejich posttranslačních modifikací v rostlinách.

**Klíčová slova:** tubulin, mikrotubuly, izotypy, posttranslační modifikace, tubulinové genové rodiny, rostlinná buňka, tubulinový kód

## Abstract

Microtubules, which are made of polymers of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin, are an integral part of the cytoskeleton. Both types of tubulin share a considerable sequential homology across eukaryotic organisms. Tubulins are encoded by relatively large gene families. The expression of these genes produces different tubulin isotypes, some of which may exhibit different properties. Tubulin isotypes can be further posttranslationally modified. The best known posttranslational modifications of tubulin include acetylation, phosphorylation, tyrosination, polyglutamylation and polyglycylation. The tubulin code arises from the combination of expression of different tubulin isotypes and their posttranslational modifications. As a consequence, microtubules in cells can be composed of a „mixture“ of different tubulins with distinct functions and properties. Even though the existence of the tubulin code has been proven in every model organism, plants included, the precise understanding of the importance of microtubules being composed of different tubulins is still subjected to research. Much of the research on the tubulin code has been carried out on animal models. In contrast, relatively little is known about the existence of the tubulin code in plants. This theses summarizes current knowledge on the localization and function of tubulin isotypes and their posttranslational modifications in plants.

**Key words:** tubulin, microtubules, isotypes, posttranslational modifications, tubulin gene families, plant cell, tubulin code

## Seznam zkratk

$\alpha$ TAT1	$\alpha$ -Tubulin acetyltransferáza 1 ( $\alpha$ -tubulin acetyltransferase)
ABA	Kyselina abscisová (abscisic acid)
CDZ	Kortikální zóna dělení (cortical division zone)
CMTs	Kortikální mikrotubuly (cortical microtubules)
ELP3	Elongator complex protein 3
GA	Kyselina giberelová (giberelic acid)
HDAC6	Histondeacetyláza 6 (histon deacetylase 6)
MAPs	Proteiny asociované s mikrotubuly (mikrotubule-associated proteins)
PPB	Preprofázový prstenec (preprophase band)
PTMs	Posttranslační modifikace (posttranslational modifications)
SIRT2	NAD <sup>+</sup> dependentní deacetyláza sirtuin 2 (silent information regulator 2)
TBP	Polymorfismus na bázi tubulinu (tubulin-based polymorphism)
TTL	Tubulintyrozinligáza (Tubulin tyrosine ligase)

# Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Struktura mikrotubulu.....	1
1.2. Struktura $\alpha\beta$ -tubulinového heterodimeru .....	2
1.3. Dynamika mikrotubulů.....	3
1.4. Mikrotubulární útvary v buněčném cyklu rostlin .....	4
2. Izotypy tubulinu .....	5
2.1. Tubulinové izotypy v rostlinách .....	6
2.2. Funkční specifita tubulinových izotypů .....	10
3. Posttranslační modifikace .....	12
3.1. Acetylace .....	13
3.1.1. Acetylace v rostlinách .....	15
3.2. Fosforylace .....	17
3.2.1. Fosforylace v rostlinách .....	17
3.3. Tyrozinační cyklus .....	18
3.3.1 Tyrozinační cyklus v rostlinách .....	19
3.4. Polyglutamylace a polyglycylace .....	20
3.4.1 Polyglutamylace a polyglycylace v rostlinách.....	22
4. Závěr .....	23
Seznam použité literatury .....	24

# 1. Úvod

Mikrotubulární cytoskelet se vyskytuje ve všech eukaryotických buňkách, kde plní životně důležité funkce. Mikrotubuly tvoří dělicí vřeténko, zprostředkovávají vezikulární transport, kotví organely, účastní se signální transdukce a umožňují pohyb cilií, čímž výčet jejich schopností zdaleka není u konce. Takto rozličné funkce mohou vykonávat i díky interakci s mnoha asociovanými proteiny, tzv. MAPs (microtubule-associated proteins).

O mikrotubulu se často zjednodušeně mluví jako o polymeru  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulinu, ovšem skutečnost je komplikovanější. Tubuliny v mnohobuněčných organismech bývají kódovány několika geny, jejichž produkty tvoří tzv. izotypy tubulinu. Tím komplexita mikrotubulů nekončí, neboť jednotlivé izotypy mohou být dále posttranslačně modifikovány, čímž vznikají různé tubulinové izoformy. Díky tomu mohou být mikrotubuly ve výsledku značně heterogenní.

Kombinace izotypů a posttranslačních modifikací tvoří tzv. tubulinový kód, který může být čten různými proteiny a určovat stabilitu a organizaci mikrotubulů. Za poslední roky se naše poznatky o tubulinovém kódu značně rozrostly, přesto ani v nejprozkoumanějších organismech nelze zatím přesně vymezit jeho roli. Velká část výzkumu tubulinového kódu probíhala v živočišných modelech. Výsledky této práce byly nedávno shrnuty ve dvou kvalitních rešerších (Janke a Magiera, 2020; Roll-Mecak, 2019). Oproti tomu v rostlinách je toho o tubulinovém kódu známo mnohem méně. Od posledních velkých rešerší na toto téma (Breviario et al., 2013; Parrotta et al., 2014) již uplynulo několik let, během kterých došlo k několika zajímavým objevům.

Cílem této práce je shrnout dostupnou literaturu o tubulinovém kódu v rostlinách a doplnit ji poznatky získanými z jiných organismů. Naopak mým záměrem není shrnout zde všechny znalosti o tubulinovém kódu v živočiších, na což by rozsah této práce ani nestačil.

## 1.1. Struktura mikrotubulu

Mikrotubulus je dutá cylindrická struktura s vnějším průměrem okolo 25 nm. Základním stavebním blokem mikrotubulů jsou heterodimery  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulinu. Ty se longitudinálně skládají do protofilament tak, že dochází k pravidelnému střídání  $\alpha$ - a  $\beta$ - podjednotek. Jednotlivá protofilamenta se dále podélně přikládají k sobě, a nakonec se uzavírají do dutého mikrotubulu. Mezi eukaryoty převažují mikrotubuly tvořené z 13 protofilament (Tilney *et al.*, 1973).

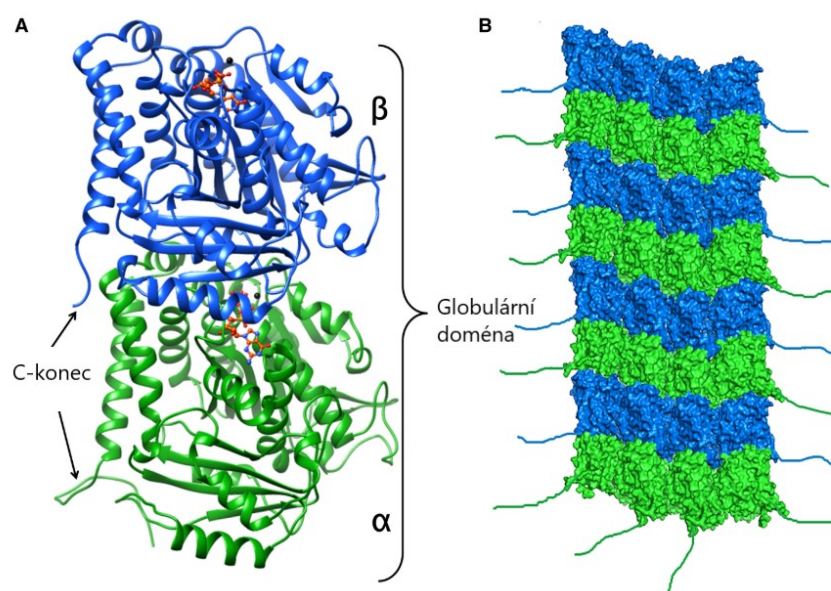
Ze způsobu, jakým je mikrotubulus tvořen, vyplývá existence přirozené polarity. Konec, na kterém se nachází  $\alpha$ -tubulin je nazýván minus-konec. Druhý, tzv. plus-konec, je zakončen podjednotkami  $\beta$ -tubulinu. *In vitro* mají oba konce schopnost růst. *In vivo* však polymerizuje převážně plus-konec, neboť minus-konec bývá kotven a stabilizován dalšími proteiny (shrnuto v Akhmanova a Steinmetz, 2019).

*In vitro* za vysoké koncentrace tubulinu polymerizují tubulinové podjednotky samovolně. V buňce bývá koncentrace tubulinu nižší, tudíž je potřeba nukleačních míst. U živočichů za tímto účelem vznikl centrozom, který kotví minus-konce. Cévnaté rostliny, s výjimkou spermatid a spermatozoidů, centrozom nemají (Smirnova a Bajer, 1992). Místo toho jsou jejich nukleační místa rozptýlena v buňce, například podél plasmatické a jaderné membrány či plastidů (shrnutí v Lee a Liu, 2019). Kromě výše zmíněných nukleačních míst se u rostlin vyskytují komplexy schopné nukleovat mikrotubuly i jinde, například podél již existujících mikrotubulů (Murata et al., 2005).

## 1.2. Struktura $\alpha\beta$ -tubulinového heterodimeru

$\alpha$ -Tubulin a  $\beta$ -tubulin jsou proteiny s molekulární hmotností okolo 50 kDa, které obsahují přibližně 450 aminokyselin.  $\alpha$ - a  $\beta$ - podjednotky tubulinu jsou přibližně z 40 % sekvenčně homologní (Kraus et al., 1981). Jejich sekundární struktura je téměř identická až na několik oblastí souvisejících s funkcí (Nogales et al., 1998).

Struktura  $\alpha\beta$ -heterodimeru je znázorněna na obrázku 1. Každá podjednotka je tvořena jádrem ze dvou beta-skládaných listů obklopených 12 alfa-helixy (Nogales et al., 1998). Rozlišujeme tři domény: N-koncovou doménu obsahující GTP-vazebnou oblast, doménu vážící taxol a C-koncovou doménu s variabilní oblastí, která ční na povrch mikrotubulu (Nogales et al., 1998). C-koncová oblast si zaslouží speciální pozornost, neboť je místem největší variability mezi izotypy a také zde probíhají rozličné posttranslační modifikace (shrnutí v Janke a Magiera, 2020).

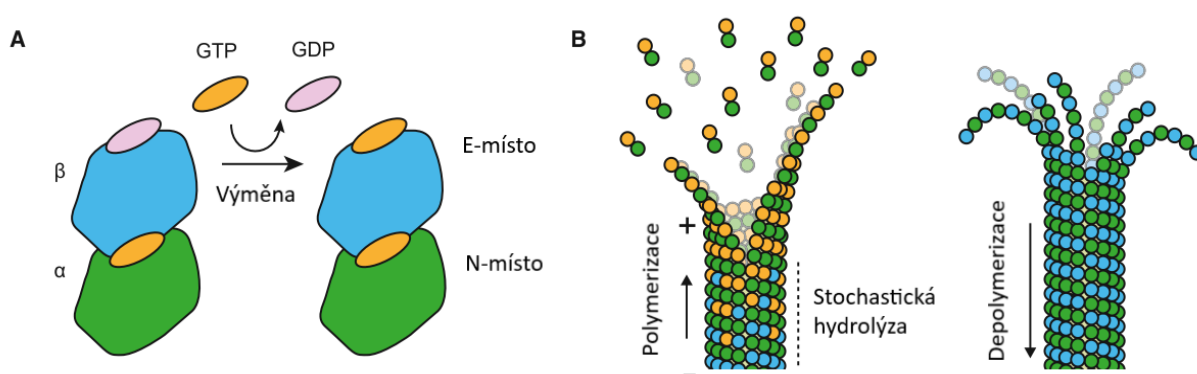


**Obrázek 1** - **A** Krystalická struktura  $\alpha\beta$ -heterodimeru s navázaným GTP a GDP (červeně) v  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulinu. Oba tubuliny mají podobnou strukturu, kromě neuspořádaných C-konců. **B** Povrchové vyobrazení mikrotubulu. Globulární domény tvoří tělo mikrotubulu, zatímco C-konce ční do prostoru. Upraveno podle Prassanawar a Panda, 2019.

C-konce tubulinů mají dva společné rysy. Zaprvé se nacházejí na povrchu mikrotubulu, kde se mohou flexibilně pohybovat a ovlivnit vazbu MAPs. Za druhé jsou záporně nabitě s převahou glutamátů mezi kterými jsou rozmístěny především nepolární aminokyseliny (shrnutí v Roll-Mecak, 2015). Na tyto glutamáty mohou být posttranslačně připojeny další aminokyseliny, které mohou ovlivnit celkový náboj (shrnutí v Roll-Mecak, 2019). Velikost náboje a pozice glutamátů se mezi jednotlivými izotypy liší a je možné, že těchto rozdílů může buňka využít pro jemnou regulaci mikrotubulárních vlastností.

Každý monomer váže jednu molekulu GTP. N-místo (non-exchangeable) na  $\alpha$ -tubulinu váže GTP ireverzibilně. Nachází se na rozhraní mezi podjednotkami a jeho role je pravděpodobně strukturní (Menéndez et al., 1998).  $\beta$ -tubulin obsahuje E-místo (exchangeable), které vyčnívá na povrch. Vazba GTP v E místě je reverzibilní a je nezbytná pro zabudování dimeru do mikrotubulu (Downing and Nogales, 1998).

Volný tubulinový dimer s GTP v E-místě zaujímá rovnou konformaci. Po hydrolýze GTP dojde k posunu podjednotek vůči sobě do tzv. zakřivené konformace (Nogales et al., 1998). Pokud je však tubulinový dimer zabudován do mikrotubulu, jeho konformace se po hydrolýze výrazně nezmění, neboť je okolím udržován v původním tvaru (Nogales et al., 1998). Jakmile je vliv sousedních podjednotek oslaben, k čemuž dochází při depolymerizaci, dimery mohou zaujmout zakřivenou konformaci, což má za následek kroucení a odlupování konců protofilament (Obrázek 2).



**Obrázek 2 - A** Pro zabudování dimeru do mikrotubulu je nutná výměna GDP za GTP v E-místě. **B** Při polymerizaci jsou do mikrotubulu zabudovávány heterodimery s navázaným GTP. Po zabudování dochází stochasticky k jeho hydrolýze. Dokud je na plus-konci čepička z GTP, tak mají mikrotubuly tendenci polymerizovat. Naopak mikrotubulus s GDP je nestabilní a rychle depolymerizuje. Upraveno podle Alushin et al., 2014.

### 1.3. Dynamika mikrotubulů

Mikrotubulární cytoskelet podléhá neustálé přestavbě, během níž některé mikrotubuly rostou a jiné se rozpadají. Pro tento jev byl zaveden pojem dynamická nestabilita (Mitchison a Kirschner, 1984). Změna z elongace v rapidní depolymerizaci se nazývá katastrofa. Během ní

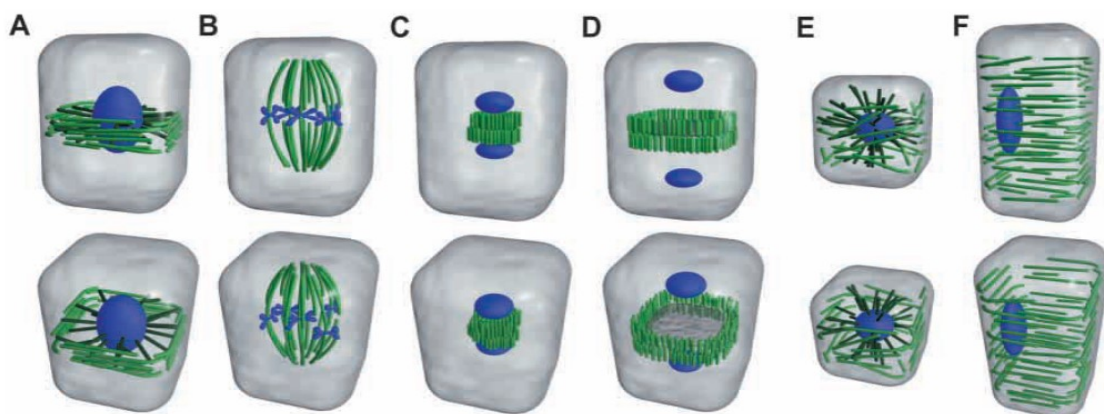


dochází k rozvolnění spojů mezi protofilamenty. Protofilamenta se začnou odlupovat a z jejich konců rychle disociují jednotlivé heterodimery. Tento jev může být za určitých okolností zvrácen. Pak dochází k tzv. záchraně. Depolymerizace se zastaví a opět dochází k růstu. *In vivo* je dynamika významně ovlivněna aktivitou MAPs (shrnutí v Akhmanova a Steinmetz, 2015).

#### 1.4. Mikrotubulární útvary v buněčném cyklu rostlin

Rostlinné mikrotubuly tvoří během buněčného cyklu čtyři rozdílné struktury. Jedná se o kortikální mikrotubuly, preprofázový prstenec, dělicí vřeténko a fragmoplast (Obrázek 3). S výjimkou dělicího vřeténka jsou tyto útvary specifické pouze pro rostliny.

Kortikální mikrotubuly (CMTs) byli poprvé popsány již v roce 1963 (Ledbetter a Porter, 1963). Vyskytují se těsně pod povrchem membrány kolmo k hlavní ose růstu. Bylo prokázáno, že navádějí pohyb celulózasyntázového komplexu a tím ovlivňují depozici buněčné stěny (Paredes et al., 2006). Zároveň jsou schopny zpracovávat signály z okolí a reorganizovat se podle vnějších i vnitřních stimulů (shrnutí v Nick, 1998). CMTs se objevují po skončení cytokineze a přetrvávají až do G2 fáze.



**Obrázek 3-** Schématické znázornění mikrotubulárních struktur během buněčného cyklu rostlin. Zeleně jsou znázorněny mikrotubuly, jádro je vyobrazeno modře. **A** Preprofázový prstenec tvoří tenký kruh kolem jádra. **B** Dělicí vřeténko během metafáze. **C** Fragmoplast vzniká mezi dceřinými jádry po skončení karyokineze. **D** Fragmoplast se centrifugálně rozpíná a je vytlačován buněčnou deskou vznikající ve středu buňky. **E** Po skončení cytokineze se krátce objevují radiální mikrotubuly nukleované z jaderné membrány. **F** Pro buňku v interfázi jsou typické kortikální mikrotubuly, které jsou vůči sobě paralelní a kolmé na směr růstu. Převzato z Wasteneys, 2002.

Během G2 fáze se kortikální mikrotubuly rozvolňují a začíná se tvořit preprofázový prstenec (PPB; Mineyuki, Wick a Gunning, 1988). Ten je složen z mikrotubulů koncentrovaných do úzkého pruhu kolem jádra. PPB označuje místo, kde po rozdělení vznikne nová buněčná stěna (Mineyuki et al., 1991), tzv. kortikální zónu dělení (CDZ). Ta přetrvává i po rozvolnění PPB a po skončení telofáze spolu s fragmoplastem určuje pozici buněčné desky. Nedávný výzkum ukazuje, že k vytvoření CDZ dochází i v mutantech postrádajících PPB (Schaefer et al., 2017). Oproti nemutovaným rostlinám však mají 2-3,2x větší variabilitu v úhlu

dělení, což naznačuje, že PPB funguje spíše jako stabilizátor nežli primární determinant CDZ (Schaefer et al., 2017). PPB se tvoří pouze v buňkách, které mají buněčnou stěnu, v endospermu a gametofytu jeho funkci zastupují radiální mikrotubuly nukleované z jaderné membrány (Brown et al., 2002).

Zatímco se tvoří PPB tak dochází k radiaci mikrotubulů z jaderné membrány. Tyto mikrotubuly budou později tvořit dělicí vřeténko. Během profáze začne PPB ubývat ve prospěch dělicího vřeténka a po rozpadu jaderné membrány zmizí PPB úplně. Dělicí vřeténko sice není strukturou specifickou pouze pro rostliny, přesto zde najdeme rostlinná specifika. Na rozdíl od živočichů, kde jsou mikrotubuly dělicího vřeténka organizovány z centrozomů, mají vyšší rostliny rozptýlená centra organizující mikrotubuly (shrnutí v Smirnova a Bajer, 1992). Výjimku tvoří spermatidy bezcévných rostlin a spermatozoidy jinanů a cykasů (Hackenberg a Twell, 2019).

Během telofáze se v místě bývalého PPB tvoří fragmoplast. Jedná se o útvar z mikrotubulů, aktinových filament a membrán, s nímž je asociováno množství proteinů. Tyto proteiny jednak stabilizují mikrotubuly, dopravují váčky a směřují další proteiny do CDZ a dále mají regulační funkci (shrnutí v Buschmann a Müller, 2019). Hlavní rolí fragmoplastu je kontrola tvorby buněčné desky. Ta se z centra centrifugálně rozpíná k okrajům až nakonec splyne s buněčnou stěnou. Tento způsob cytokineze se zásadně liší od živočichů, u kterých je cytokineze dokončena zaškrcením pomocí aktinomyosinového komplexu.

Ke konci cytokineze lze krátce pozorovat strukturu mikrotubulů, které vyrůstají nejprve z oblasti pólů vřeténka a následně z nově vytvořené jaderné obálky. Jedná se o síť radiálních mikrotubulů, které představují přechodný stav mezi koncem karyokineze a znovuoobením interfázních kortikálních mikrotubulů (Wick, 1985). Pravděpodobně se jedná o evolučně původní strukturu, jelikož se nachází i u rostlinných buněk, které netvoří PPB a rovinu dělení u nich určují radiální mikrotubuly (shrnutí v Livanos a Müller, 2019).

## 2. Izotypy tubulinu

Většina mnohobuněčných organismů ve svém genomu kóduje několik genů pro  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubulin, které často tvoří produkty s odlišným aminokyselinovým složením. Tyto proteiny byly nazvány tubulinové izotypy. Některé organismy včetně rostlin, například len setý (*Linum usitatissimum*) ale i huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), kódují více genů pro identický produkt (Gavazzi et al., 2017; Kopeczak et al., 1992). Produkty těchto genů v této práci počítám jako jediný izotyp. Přesto i přes stejné aminokyselinové složení mohou mít tyto proteiny odlišný způsob regulace, čímž také mohou přispívat do tvorby tubulinového kódu.

Jednotlivé tubulinové izotypy jsou napříč organismy silně konzervovány. Navíc jsou si izotypy ze stejných tříd často podobnější i mezi málo příbuznými druhy než jednotlivé izotypy

tubulinu z různých tříd v rámci jednoho organismu (Fosket a Morejohn, 1992). Obecně bývají tubulinové izotypy odlišně regulovány. Některé z izotypů jsou exprimovány konstitutivně, zatímco jiné se vyskytují pouze v některém orgánu či vývojovém stádiu (Dixon et al., 1994; Gavazzi et al., 2017; Oakley et al., 2007; Sullivan, 1988).

Toho, že jsou geny pro tubulin tak početné a přitom relativně konzervované, bylo využito v metodě „tubulin-based polymorphism“ (TBP). Ta využívá toho, že jednotlivé organismy se liší v délce intronů  $\beta$ -tubulinu při zachování konzervovaného rozhraní exon-intron. Díky tomu dokáže určit druhové složení vzorku bez nutnosti sekvenace (Morello et al., 2019). TBP lze dobře použít i pro živočišné vzorky, ale nejlepší rozlišení má u rostlin, kde lze v některých případech od sebe odlišit i jednotlivé kultivary (Morello et al., 2019). Tato metoda tak představuje alternativu ke klasickým sekvenačním technikám s potenciálem pro mnoho využití, například při kontrole druhového složení potravin.

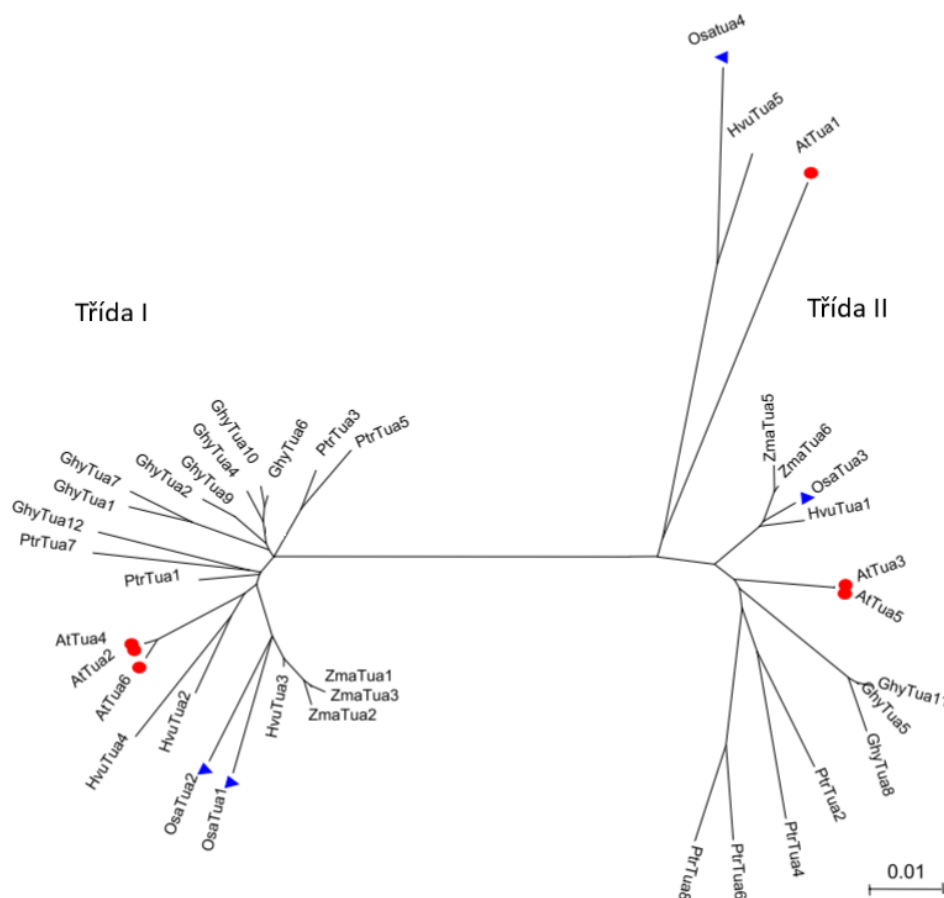
## 2.1. Tubulinové izotypy v rostlinách

Rostlinné a živočišné tubuliny jsou přibližně ze 79 % homologní (Silflow et al., 1987). Přesto jsou si rostlinné tubuliny podobnější s tubuliny řas a prvoků než s živočišnými tubuliny (Morejohn a Fosket, 1986). V rostlinné říši existuje oproti živočichům větší variabilita v počtu izotypů tubulinu.

Nejmenší variabilita tubulinových izotypů je v rostlinné říši pozorována u řas. *Chlamydomonas reinhardtii* tvoří pouze dva téměř identické izotypy  $\alpha$ -tubulinu a jeden  $\beta$ -tubulin (Silflow et al., 1985; Youngblom et al., 1984). *Volvox carteri* vytváří pouze jeden izotyp  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulinu, každý kódován dvěma geny silně homologickými s tubuliny z *Ch. reinhardtii* (Harper a Mages, 1988; Mages et al., 1988, 1995). U mechorostů již došlo k několikanásobné genové duplikaci. Čepenka odstálá (*Physcomitrella patens*) kóduje 6 genů pro  $\beta$ -tubulin, které jsou si sice značně podobné, včetně C-konců, ale už se některé z nich liší místem své exprese (Jost et al., 2004). V krytosemenných rostlinách se rozpětí  $\alpha$ -tubulinových izotypů pohybuje od 4 v huseníčku po 12 v bavlníku chlupatém (*Gossypium hirsutum*; Breviario et al., 2013; Kopczak et al., 1992).  $\beta$ -tubulinová rodina je ještě obsáhlejší s rozsahem od 8 izotypů v rýži seté (*Oryza sativa*) po 20 izotypů v topolu osikovém (*Populus tremuloides*; Oakley et al., 2007; Yoshikawa et al., 2003). Pro srovnání, lidský genom kóduje 9 genů pro  $\alpha$ - a 9 pro  $\beta$ -tubulin (Tubulins | HUGO Gene Nomenclature Committee, stav k 25.4.2020).

Rostlinné  $\alpha$ -tubuliny se dělí do dvou tříd (Obrázek 4). Třída I obsahuje izotypy, které mají podobnou sekvenci a jsou exprimovány především ve vegetativních orgánech (shrnutí v Radchuk, 2009). Tubuliny z této třídy nejčastěji obsahují tři introny, jejichž pozice se mezi jednotlivými izotypy liší. Hned v modelovém organismu huseníčku se najdou výjimky, neboť AtTUA6 si zachoval pouze první intron a AtTUA4 obsahuje dva (Kopczak et al., 1992). Třída II se skládá z více diverzifikovaných tubulinů, které mají 4 introny na konzervovaných pozicích

(shrnutí v Radchuk, 2009). V této třídě se často nachází izotypy specificky exprimované v pylu (Carpenter *et al.*, 1992; Oakley *et al.*, 2007; Yoshikawa *et al.*, 2003).



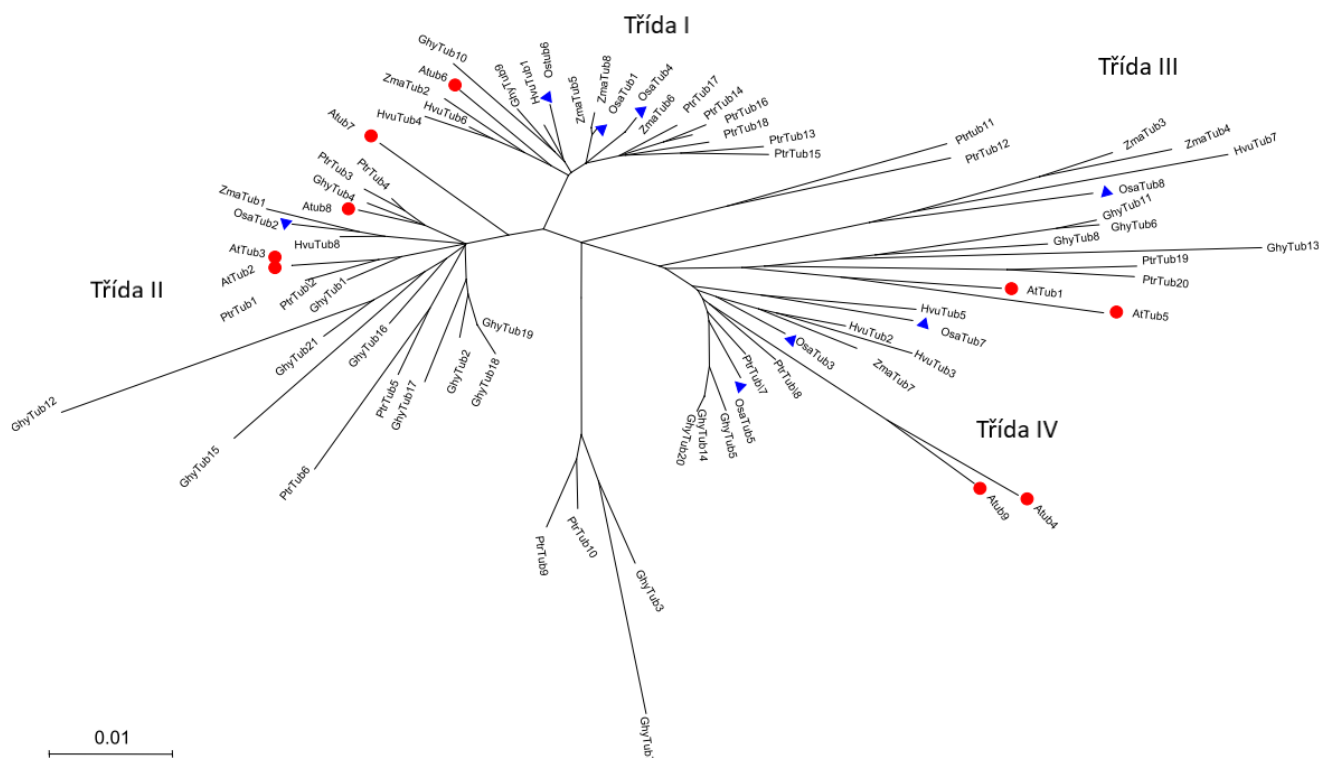
**Obrázek 4** – Minimální nezakořeněný evoluční strom pro  $\alpha$ -tubuliny vybraných dvouděložných a jednoděložných rostlin. AtTua1-6 - *Arabidopsis thaliana* (zvýrazněno červeně), GhyTua1-12 – *Ghossipium hirsutum*, HvuTua1-5 – *Hordeum vulgare* (ječmen setý), OsaTua1-4 – *Oryza sativa* (zvýrazněno modře), PtrTua1-8 – *Populus tremuloides*, ZmaTua1-6 – *Zea mays* (kukuřice setá). Upraveno podle Breviario *et al.*, 2013.

$\beta$ -tubuliny se dělí do čtyř tříd (Obrázek 5; Breviario *et al.*, 2013). Většina  $\beta$ -tubulinů má dva introny v konzervovaných pozicích. Výjimku tvoří některé jednoděložné, které si zachovaly pouze první intron a dále skupina genů včetně AtTUB6 a OsTUB4, které mají třetí intron v 5' nepřekládané oblasti (shrnutí v Radchuk, 2009).

Ve všech rostlinných třídách  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubulinů se nachází zástupci jednoděložných i dvouděložných rostlin, což značí, že k diverzifikaci tubulinů došlo ještě před oddělením těchto dvou tříd (Ludueña, 1998). Jelikož však geny z čepenky tvoří skupinu oddělenou od ostatních, pravděpodobně k této diverzifikaci došlo až po rozdělení cévnatých rostlin a mechorostů (Jost *et al.*, 2004).

U rostlin i živočichů se často liší exprese tubulinů mezi vegetativními a generativními orgány (shrnutí v Sullivan, 1988). V rostlinných vegetativních pletivech bývá exprimováno větší množství izotypů, jejichž funkce se pravděpodobně překrývají (Kopczak *et al.*, 1992;

Oakley et al., 2007; Snustad et al., 1992). Částečně se liší kompozice tubulinů v dělivých a diferencovaných pletivech (Parrotta et al., 2010; Schröder et al., 2001).



**Obrázek 5** - Minimální nezakořeněný evoluční strom pro  $\beta$ -tubuliny vybraných dvouděložných a jednoděložných rostlin. AtTub1-9 – *Arabidopsis thaliana* (zvýrazěno červeně), GhvTua1-20 – *Ghossipium hirsutum*, HvuTua1-7 – *Hordeum vulgare*, OsaTua1-8 – *Oryza sativa* (zvýrazněno modře), PtrTua1-20 – *Populus tremuloides*, ZmaTua1-8 – *Zea mays*. Upraveno podle Breviario et al., 2013.

V několika rostlinách byly objeveny izotypy asociované s tvorbou sekundární buněčné stěny (Oakley et al., 2007; Spokevicius et al., 2007; Whittaker a Triplett, 1999). V blahovičníku (*Eucalyptus grandis*) bylo přímo prokázáno, že EgrTUB1 při nadměrné expresi ovlivňuje orientaci celulósových mikrofibril (Spokevicius et al., 2007). Depozice sekundární buněčné stěny, na jejíž tvorbě se podílí kortikální mikrotubuly, je charakteristická pro xylém. V souladu s tím bylo vypořádováno, že diferencující se xylémová vlákna mají odlišné izotypové složení (Chu et al., 1998; Oakley et al., 2007; Spokevicius et al., 2007; Yoshimura et al., 1996). Velká pozornost byla pro hospodářský význam věnována vláknitým trichomům bavlníku. Jedná se o druhotně tloustnoucí trichomy, které během vývoje exprimují specifický set izotypů (Dixon et al., 1994; Li et al., 2002; Whittaker a Triplett, 1999). Za zmínku stojí, že čtyři  $\beta$ -izotypy bavlníku mají 2-4 nukleotidovou inzerci na pozici 39, v těsné blízkosti acetylovatelného K40. Tyto izotypy nebyly schopné komplementovat kmen kvasinky pивní (*S. cerevisiae*) deficientní v  $\beta$ -tubulinu, což naznačuje, že by mohly mít specifické vlastnosti (He et al., 2008).

Stejně jako v živočiších (Kemphues et al., 1979; Lewis a Cowan, 1988) i v rostlinách obvykle samčí orgány obsahují specifický set tubulinových izotypů, které se v jiných

buněčných typech nevyskytují vůbec nebo jen v malé míře. Z rostlinných izotypů se jedná například o AtTUA1 a AtTUB9 v huseníčku (Carpenter et al., 1992; Cheng et al., 2001), OsTUB8 v rýži (Yoshikawa et al., 2003), nebo PwTUA1 ve smrku (*Picea wilsonii*; Yu et al., 2009). PwTUA1 při umělé expresi v huseníčku zvyšuje klíčivost pylu a způsobuje rychlejší růst pylové láčky (Yu et al., 2009). Jeden z nejodlišnějších rostlinných  $\alpha$ -tubulinů se nachází pouze ve zralém pylu čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*). Podle strukturního modelu tento tubulin po zabudování do mikrotubulu oslabuje interakce mezi protofilamenty a destabilizuje mikrotubuly (Evrard et al., 2002). Zda k této destabilizaci opravdu dochází *in vivo* zatím nebylo prokázáno. Tato destabilizující tendence by mohla být pro rostlinu přínosná, neboť v dehydratovaném pylu jsou mikrotubuly depolymerizovány (shrnutí v Pierson a Cresti, 1992). Zda by takovýto efekt mohly mít i další izotypy specifické pro pyl, zatím nebylo prozkoumáno.

Transkripce tubulinu je ovlivněna fytohormony (Mendu a Silflow, 1993; Yoshimura et al., 1996). He *et al.* prokázali, že jednotlivé izotypy  $\beta$ -tubulinu z vyvíjejících se vláken bavlníku reagují různým způsobem na brassinosteroidy, ethylen, gibereliny (GA) a kyselinu lignocerovou (2008). Každý z izotypů reagoval pouze na některé z těchto fytohormonů. Podobně při působení GA začaly být silněji exprimovány jen některé  $\beta$ -tubulinové izotypy rýže (Yoshikawa et al., 2003). Ve stejné studii naopak působení kys. abcisové (ABA) snížilo transkripci všech izotypů. Auxin na transkripci tubulinu nemá sám o sobě vliv, ale do jisté míry dokáže zvrátit působení ABA (Giani et al., 1998).

Expres tubulinů reaguje na světlo. Po ozáření etiolovaných hypokotylů dochází ke snížení exprese všech  $\beta$ -tubulinů huseníčku. Největší rozdíl v expresi byl pozorován u AtTUB1, přičemž tento proces zahrnoval aktivaci receptorů červeného světla PhyA a PhyB (Leu Wei-Ming et al., 1995). Zajímavé je, že AtTUB1 se vyskytuje především v kořeni a etiolovaných hypokotylech, tudíž je možné, že by mohl být spojen s dlouhivým růstem ve tmě (Leu Wei-Ming et al., 1995). Podobně je světlem regulována transkripce divergentního izotypu sóji luštinaté (*Glycine max*), který se též vyskytuje převážně v etiolovaném hypokotylu (Han et al., 1991). Kromě AtTUB1 byl s dlouhivým růstem korelován také  $\beta$ -tubulin z vláknitých trichomech bavlníku (Ji et al., 2002). Zatím však neexistují přímé důkazy, že by exprese určitého izotypu v etiolovaných hypokotylech nebo jiných orgánech svými vlastnostmi významně přispívala rychlému růstu.

Detailněji byl zkoumán vliv tubulinových izotypů při chladové aklimaci. V kořenech zimního kultivaru žita setého (*Secale cereale*) byla po 2-4 denní chladové aklimaci v 4°C pozorována odlišná transkripce izotypů než u kontrolních rostlin pěstovaných v 22°C (Kerr a Carter, 1990a). V této studii však nebylo vyšetřeno, do jaké míry se jedná o expresi různých genů, a do jaké jde o změnu posttranslačních modifikací. K podobným závěrům došla i studie zkoumající aklimaci na listech huseníčku s tím rozdílem, že zatímco v žitu se více lišila transkripce  $\alpha$ -tubulinu, v huseníčku bylo při aklimaci více pozměněno složení  $\beta$ -tubulinů (Chu et al., 1993). Během chladové aklimace nejprve dochází ke krátkodobé depolymerizaci mikrotubulů a následně k polymerizaci mikrotubulů odolnějších vůči mrazu (Kerr a Carter, 1990b).

V experimentu se třemi kultivary pšenice seté (*Triticum aestivum*) bylo zjištěno, že úspěšnost aklimace je určena rychlostí a mírou krátkodobé depolymerizace (Abdrakhamanova et al., 2003). Čím rychleji a důkladněji dokázal kultivar depolymerizovat mikrotubuly, tím byl odolnější vůči působení mrazu. V témže experimentu byla během aklimace pozorována snížená exprese určitých izotypů u dvou zimních kultivarů, zatímco u senzitivního kultivaru zůstala exprese těchto izotypů nezměněna. Během aklimace také vzrostl podíl tyrozinovaného tubulinu, který je spojován s dynamickými mikrotubuly (Abdrakhamanova et al., 2003; Schneider et al., 2015).

V souhrnu lze říct, že rostliny disponují poměrně velikou sadou tubulinových izotypů, které by teoreticky mohly být využity pro různé účely. Expresa jednotlivých izotypů je regulována vnitřními i vnějšími signály. Za povšimnutí stojí, že děje specifické pro rostliny, např. sekundární tloušťnutí, vývoj vodivých pletiv nebo růst pylové láčky, jsou doprovázeny expresí odlišných izotypů. Zda-li jednotlivé izotypy dodávají mikrotubulům specifické funkce, však zatím není u rostlin známo.

## 2.2. Funkční specifita tubulinových izotypů

O tom, zda jsou jednotlivé izotypy strukturně přizpůsobeny k tomu plnit odlišné funkce, či zda za udržení početných tubulinových rodin stojí pouze jejich odlišná regulace, se vede polemika prakticky od doby jejich objevu (Raff, 1984).

Již v 80. letech byl proveden pokus s chimérickými tubuliny, které byly složeny z globulární domény  $\beta 2$  tubulinu kuřete a C-koncové domény  $\beta$ -tubulinu z kvasinky. Tyto tubuliny byly následně transfektovány do myší buněčné kultury. Po transfekci se zabudovávaly do různých mikrotubulárních struktur se stejnou účinností jako endogenní tubuliny, což značí velkou plasticitu mikrotubulárního cytoskeletu (Bond et al., 1986). Stejnou výzkumnou skupinou byl proveden další experiment, v němž kvasinková sekvence zasahovala větší měrou do N-koncové části. Tyto chimérické tubuliny se zabudovávaly do mikrotubulů s daleko nižší účinností a také byly rychleji degradovány (Fridovich-Keil et al., 1987). Ukázalo se, že plasticita mikrotubulů není neomezená.

Jelikož se od sebe některé izotypy liší i v pozicích, které se účastní inter nebo intradimerových kontaktů, předpokládalo se, že by mohly mít rozdílný vliv na mikrotubulární dynamiku. Dlouhou dobu to nebylo možné experimentálně ověřit, neboť výzkum dynamiky probíhal hlavně na tubulinu ze savčího mozku, který je obohacen o množství tubulinových izotypů a posttranslačních modifikací. V poslední době se podařilo purifikovat rekombinantní tubulin, čímž vznikla možnost pozorovat mikrotubuly s konkrétním izotypovým složením. Z těchto výzkumů vyplynulo, že mikrotubuly složené z různých izotypů doopravdy mají *in vitro* odlišnou dynamiku (Honda et al., 2017; Vemu et al., 2017). Také se zjistilo, že jednotlivé izotypy spolu mohou polymerizovat do jednoho mikrotubulu (Pamula et al., 2016; Vemu et al., 2017). Kromě dynamiky navíc izotypové složení může ovlivnit i počet protofilamentů v mikrotubulu (Raff et

al., 1997; Ti et al., 2018). Dále byl proveden experiment s lidskými rekombinantními tubuliny, které se skládaly ze strukturovaného globulárního jádra jednoho izotypu a C-konce jiného. Tyto tubuliny vykazovaly stejnou dynamiku jako izotyp, ze kterého pocházelo jádro (Pamula et al., 2016). Tak byl potvrzen již dříve pozorovaný vliv strukturovaného jádra tubulinu na vlastnosti mikrotubulu (Fridovich-Keil et al., 1987). Vliv C-konců přesto nelze úplně zanedbat, neboť mohou být dále různě posttranslačně modifikovány a i díky tomu různě silně vázat MAPs (shrnutí v Janke a Magiera, 2020).

Nejnázornější příklad funkční specifiity tubulinových izotypů pochází z háďátka obecného (*Coenorhabditis elegans*), které disponuje specifickými izotypy pro tvorbu senzorických cilií. Jedním z těchto genů je  $\alpha 6$ , jehož ztráta funkce vede ke změnám mikrotubulární struktury a defektům v transportu (Silva et al., 2017).  $\alpha 6$  je zajímavý tím, že na C-konci obsahuje pozitivně nabitě aminokyseliny, a naopak neobsahuje glutamát, tudíž nemůže být glutamylován. Tím potenciálně chrání cilie před nadměrnou glutamylací (Silva et al., 2017), jejíž význam bude popsán v další kapitole.

Podobný příklad najdeme u octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*). Záměna  $\beta$ II za  $\beta$ III ve varlatech vede k samčí sterilitě a defektům v tvorbě některých mikrotubulárních útvarů během spermatogeneze (Hoyle a Raff, 1990).  $\beta$ II je izotyp specifický pro varlata, zatímco  $\beta$ III se sice také vyskytuje ve varlatech, ale v jiném buněčném kontextu. Stejně tak mají v octomilce specializovanou funkci  $\alpha$ -tubuliny. Umlčení, ale též nadměrná exprese, divergentního izotypu  $\alpha$ TUB67C, vede k defektům dělení během oogeneze a raného embryonálního vývoje (Matthews et al., 1993).

Z obratlovčích  $\beta$ -tubulinů se nejvíce odlišuje třída  $\beta$ VI (shrnutí v Ludueña, 2013). Vyskytuje se především v hematopoetických buňkách (Leandro-García et al., 2010). Tento izotyp se odlišuje tím, že nejspíš preferenčně tvoří zahnuté mikrotubuly. Při umělé expresi  $\beta$ VI v tkáňové kultuře tento izotyp brání tvorbě funkčního dělicího vřeténka a zdárnému průběhu cytokineze (Yang et al., 2011). Když je naopak  $\beta$ VI umlčen ve svém přirozeném kontextu krevních destiček, tak tyto destičky ztrácí svůj typicky eliptický tvar (Schwer et al., 2001).

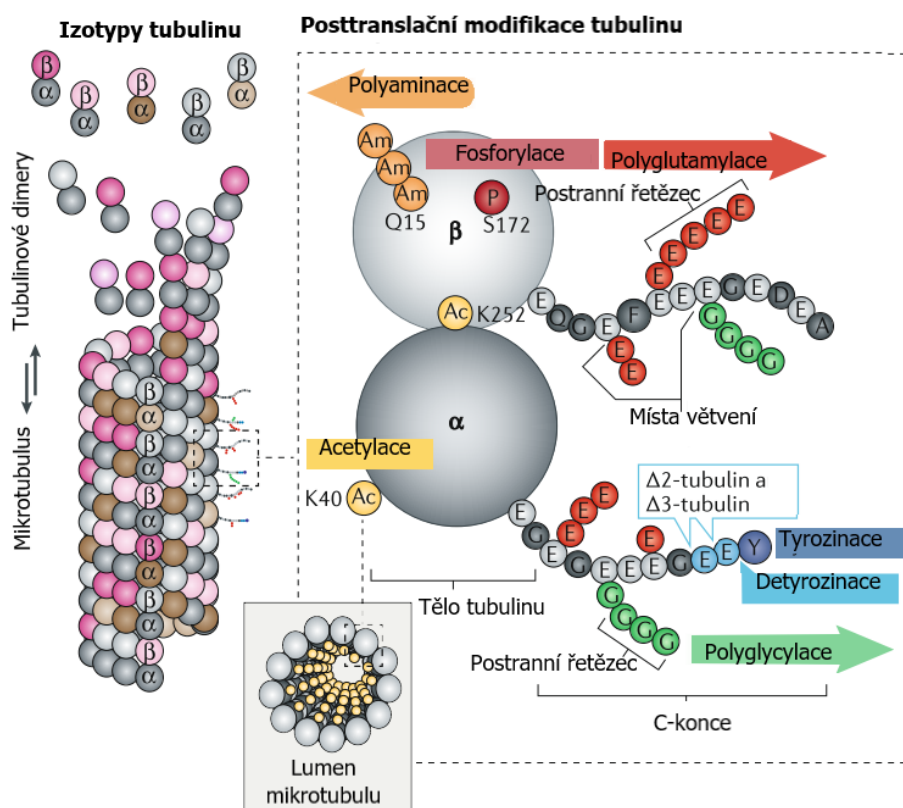
Zatím jediný experiment prokazující funkční specializaci tubulinových izotypů v rostlinách byl proveden na izotypu OsTUB8 rýže seté. OsTUB8 je v malé míře exprimován ve více pletivech, ale relativně hojný je v cévních svazcích prašníků (Yang et al., 2007). Při jeho umlčení dorůstaly mutované rostliny jen 20-60 % původní výšky a produkovaly jen 15-30 % z přirozeného množství pylu (Yang et al., 2007). Je tedy možné, že tento, byť minoritní, izotyp by mohl být potřeba pro správnou tvorbu vodivých pletiv.

Zajímavé je, že v rostlinách i živočiších pochází většina zmínek o funkční specifiitě izotypů z výzkumu na živých organismech, zatímco opačné závěry plynou z experimentů na buněčných kulturách (Hussey et al., 1987; Lewis et al., 1987). Zdá se, že jednotlivé izotypy přispívají k udržení homeostázy, což se nemusí hned projevit v krátkodobých studiích, zato v dlouhodobém měřítku života mnohobuněčných organismů může nerovnováha vyústit v patologický stav (Janke a Magiera, 2020).



### 3. Posttranslační modifikace

Posttranslační modifikace (PTMs) představují efektivní způsob, jak rychle změnit vlastnosti již syntetizovaného proteinu. Tubulin je předmětem řady takovýchto modifikací (Obrázek 6). Mezi ty lépe charakterizované patří acetylace, fosforylace, tyrozinace, glutamylace a glycy-lace (viz dílčí podkapitoly). Tubulin může dále podstoupit nitrotyrozinaci (Jaffrey et al., 2001), methylaci, palmitoylaci, polyaminaci a ubiquitinylaci (shrnutí v Janke a Magiera, 2020). Většina z těchto modifikací byla pozorována pouze v živočiších a jejich funkční význam nebyl důkladněji objasněn. V rostlinném tubulinu byly z těchto modifikací identifikovány methylace, nitrotyrozinace a polyaminace (Blume et al., 2013; Del Duca et al., 1997; Plett et al., 2017).



Obrázek 6 – Nejznámější posttranslační modifikace tubulinu. Upraveno podle Janke a Magiera, 2020.

V posledních letech bylo v živočiších objeveno mnoho enzymů, které posttranslačně modifikují tubulin. Tyto enzymy se staly mocným nástrojem studia tubulinového kódu a přinesly řadu poznatků, které shrnuji níže. V rostlinách zatím většina těchto enzymů není známa. Tím je studium vlivu tubulinových PTMs značně ztíženo. Navíc většina informací o lokalizaci a vlivu PTMs tubulinu v rostlinách pochází ze studií pomocí imunologických metod, které mohou být někdy zavádějící.

V živočiších jsou PTMs tubulinu a jejich vliv na různé životní procesy zkoumány velmi intenzivně. Z toho důvodu jsem do této rešerše shrnula pouze zásadnější práce a obecnější jevy.

Oproti tomu v rostlinách se toho zatím ví daleko méně, proto jsem se snažila zahrnout veškeré relevantní studie, které byly na toto téma vydány. I když by se tak z následujících kapitol někdy mohlo zdát, že PTMs tubulinu byly zkoumány stejně důkladně v rostlinách i živočiších, opak je pravdou.

### 3.1. Acetylace

V lidském tubulinu bylo proteomickou studií objeveno 10 acetylovaných míst na  $\alpha$ - a 9 na  $\beta$ -tubulinu (Liu et al., 2015). Zde je však nutno podotknout, že většina z nich stále čeká na ověření. Nejvíce pozornosti bylo věnováno acetylaci  $\epsilon$ -aminoskupiny lysinu 40 v  $\alpha$ -tubulinu. Tato modifikace je silně konzervována. Nachází se u řas, rostlin, živočichů i protist (Piperno a Fuller, 1985). Jedná se o jedinou dosud popsanou PTM, ke které dochází na luminální straně mikrotubulu (Nogales et al., 1999). Dále byla zkoumána acetylace K252  $\beta$ -tubulinu. V tomto případě jsou acetylovány volné tubulinové dimery a takto modifikovaný tubulin se v HeLa buňkách s nižší účinností zabudovává do mikrotubulu (Chu et al., 2011). K252 je konzervován i v rostlinách. V huseníčku je přítomen ve všech 9 izotypech  $\beta$ -tubulinu (Snustad et al., 1992). Přesto zatím nebyla acetylace K252 v rostlinách identifikována.

Acetylace K40 je u živočichů a řas spojována se stabilními mikrotubuly axonem, centriol a basálních tělísek (LeDizet a Piperno, 1986; Orbach a Howard, 2019; Piperno a Fuller, 1985). Také bazální tělíska a bičíky spermatogenních buněk kaprad'orostů jsou silně acetylovány (Hoffman a Vaughn, 1995). Tyto organely se ve většině nahosemenných a v žádných krytosemenných rostlinách nevyskytují, přesto i u nich k acetylaci dochází (Nakagawa et al., 2013a).

Od počátku byla acetylace pozorována na stabilních mikrotubulech, ale dlouho nebylo jasné, zda jsou stabilní mikrotubuly příčinou či důsledkem acetylace. Nedávný výzkum naznačuje, že acetylace doopravdy dodává mikrotubulům stabilitu, neboť je chrání před mechanickým stárnutím, při kterém dochází ke ztrátě rigidity kvůli opakovanému ohýbání (Portran et al., 2017; Xu et al., 2017). Molekulární mechanismus účinku acetylace byl objasněn teprve nedávno. K40 se nachází na flexibilní nestrukturované smyčce  $\alpha$ -tubulinu (Eshun-Wilson et al., 2019). Po acetylaci K40 se smyčka stává rigidnější, což oslabuje vzájemný kontakt mezi sousedními protofilamenty. Oslabení spojů usnadňuje vzájemné posouvání protofilament během ohybu mikrotubulu, což zvyšuje jeho pružnost (Eshun-Wilson et al., 2019). Okolí K40 je v jednotlivých izotypech velmi variabilní a tak může smyčka zaujímat rozličné konformace (shrnutí v Janke a Magiera, 2020).

Enzymy zodpovědné za acetylaci tubulinu byly objeveny relativně nedávno. U živočichů jimi jsou acetyltransferázy  $\alpha$ TAT1/MEC-17 a ELP3, obě příbuzné histonacetyltransferázám (Akella et al., 2010; Creppe et al., 2009; Shida et al., 2010). Homology  $\alpha$ TAT1/MEC-17 se nachází u většiny eukaryot, nikoliv však u rostlin (Akella et al., 2010). Na druhou stranu rostliny kódují homology ELP3 a také dalších acetyltransferáz, např. NAA10 a KAT2A, které

by mohly být kandidáty na místo rostlinné tubulinacetyltransferázy (Gardiner, 2019; Tran et al., 2012).

Zdá se, že v živočišných  $\alpha$ TAT1 acetyluje pouze tubulin, zatímco ELP3 je více promiskuitní (Creppe et al., 2009; Shida et al., 2010). Ovšem i  $\alpha$ TAT1 má více funkcí. V savčích buňkách dovede nezávisle na své acetyltransferázové aktivitě destabilizovat mikrotubuly a také v nich interaguje s doublecortinem (Kalebic et al., 2013a; Kim et al., 2013).

K acetylaci přednostně dochází uvnitř mikrotubulu, ale slabě může probíhat i na volných tubulinových dimerech (L'Hernault a Rosenbaum, 1983; Maruta et al., 1986). Pro vstup  $\alpha$ TAT1 do lumen mikrotubulu existují dvě hypotézy, které se navzájem nevylučují. První navrhuje, že enzym proniká do lumen skrz nepravidelnosti v mikrotubulární struktuře (Coombes et al., 2016). Druhá hypotéza říká, že  $\alpha$ TAT1 vniká dovnitř skrz mikrotubulární konce (Coombes et al., 2016; Ly et al., 2016). Pro acetylaci tubulinu pomocí ELP3 zatím podobná strukturní data nejsou k dispozici.

Acetylace je reversibilní, tudíž existují tubulindeacetylázy, které acetyl z lysinu odebírají. V živočišných jimi jsou enzymy HDAC6 a SIRT2, oba z rodiny histondeacetyláz (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; North et al., 2003). Oba enzymy deacetylují krom tubulinu i další substráty, například histony, E3 ubiquitinligázu, chaperon Hsp90 nebo protein kortaktin, který interaguje s aktinem (Fusco et al., 2014; Hsu et al., 2016; Kovacs et al., 2005; Zhang et al., 2007). Rostlinným homologem HDAC6 je enzym HDAC14, který má *in vitro* schopnost deacetylovat rostlinné i živočišné mikrotubuly (Tran et al., 2012). Krom toho má množství dalších substrátů a obsahuje i plastidovou lokalizační sekvenci (Hartl et al., 2017). Rostliny kódují i homology SIRT2 (Gardiner, 2019). Zda tyto homology deacetylují tubulin zatím nebylo prokázáno.

Na rozdíl od acetylace dochází k deacetylaci preferenčně na volných tubulinových dimerech (Skultetyova et al., 2017). Přesto není vyloučeno, že HDAC6 proniká i do lumen (Miyake et al., 2016). Dále je možné, že HDAC6 vstupuje do mikrotubulu skrz konce, jelikož váže EB1 (end-binding 1), což je protein autonomně vážící plus konce mikrotubulů (Zilberman et al., 2009).

U protist není acetylace K40 nezbytná pro přežití (Gaertig et al., 1995; Kozminski et al., 1993). Ani v případě lidské buněčné kultury nebrání umlčení  $\alpha$ TAT1 tvorbě mikrotubulárních struktur a průběhu dělení (Shida et al., 2010). Acetylace není pro život nepostradatelná ani v případě mnohobuněčných organismů. Myši s umlčenou  $\alpha$ TAT1 jsou na první pohled nerozlišitelné od wild typu, pouze více trpí úzkostí, mají deformovanou část hipokampu a samci jsou méně plodní, pravděpodobně vlivem abnormální morfologie bičíků spermií (Kalebic et al., 2013b; Kim et al., 2013). U živočichů je acetylace spojena s buněčnou migrací (Castro-Castro et al., 2012; Creppe et al., 2009; Montagnac et al., 2013), adhezí (Aguilar et al., 2014), vezikulárním transportem (Dompierre et al., 2007), autofagií (Geeraert et al., 2010; Xie et al., 2010), mechanorecepcí (Akella et al., 2010; Morley et al., 2016; Shida et al., 2010; Yan et al., 2018) a regulací zánětlivé odpovědi (Ishiguro et al., 2014; Wang et al., 2014). Acetylace tubulinu též

podporuje tvorbu cilií, ale není pro ni nezbytná (Pugacheva et al., 2007; Shida et al., 2010). Naopak deacetylace je nutná pro jejich resorpci (Pugacheva et al., 2007). Acetylace dále pomáhá upřesnit počet protofilament v mikrotubulech senzorických neuronů hád'átka obecného, které jsou tvořeny z 15 protofilament (Cueva et al., 2012; Topalidou et al., 2012).

Bylo navrženo, že acetylované mikrotubuly jsou preferenčním substrátem kinesinu-1 (Reed et al., 2006). Později byl pomocí *in vitro* experimentu vliv acetylace na afinitu kinesinu-1 zpochybněn (Kaul et al., 2014). Autoři však nevyklučují, že by acetylace v kombinaci s dalšími PTMs nebo izotypy přeci jen mohla hrát roli. Dále bylo prokázáno, že mikrotubulární motor dynein se jak *in vitro*, tak v axonech *Ch. reinhardtii*, pohybuje rychleji na acetylovaných mikrotubulech (Alper et al., 2014). Tento objev z hlediska vyšších rostlin nejspíš nemá velký význam, neboť dynein nekóduje (Lawrence et al., 2001). Acetylace byla také navržena jako jeden z faktorů, které v savcích buňkách činí mikrotubuly labilnější vůči štěpení kataninem (Sudo a Baas, 2010). Jelikož se acetylovaný K40 nachází v lumen mikrotubulu, není zatím jasné, jakým mechanismem MAPs tuto modifikaci rozpoznávají.

### 3.1.1. Acetylace v rostlinách

Dle imunochemických studií se v krytosemenných rostlinách nejvíce acetylovaného tubulinu nachází v listech, květech a v menší míře i v dalších orgánech (Giannoutsou et al., 2012; Gilmer et al., 1999a; Wang et al., 2004). V kořeni krytosemenných jsou mikrotubuly acetylovány jen u některých druhů (Adamakis et al., 2019; Nakagawa et al., 2013b). Oproti tomu v kořeni nahosemenných je acetylovaný tubulin přítomen během celého buněčného cyklu (Gilmer et al., 1999a). Acetylační status mikrotubulů se během vývoje rostliny mění (Nakagawa et al., 2013b). V krytosemenných je největší podíl acetylovaného tubulinu přítomen hned po vyklíčení, tudíž bylo navrženo, že by takto modifikovaný tubulin mohl hrát roli v jejich časném vývoji (Nakagawa et al., 2013a, 2013b). Je zajímavé, že acetylace mikrotubulů PPB bývá korelována s výskytem prstence endoplasmatického retikula ve stejné oblasti (Giannoutsou et al., 2012; Zachariadis et al., 2001). Funkční význam tohoto uspořádání ale zatím není znám. Je vhodné zmínit, že z 6  $\alpha$ -izotypů huseníčku obsahují lyzin na pozici 40 pouze TUA2/4 a TUA6, zatímco TUA 3/5 mají na jeho místě threonin a TUA1 serin (Kopczak et al., 1992). Huseníček tak teoreticky může expresí různých izotypů ovlivnit, jaký podíl mikrotubulů bude acetylovatelný.

U živočichů je acetylace tubulinu důležitá pro mnoho procesů (viz výše). Rozklíčovat význam acetylace u rostlin je složitější. Rostliny huseníčku, ve kterých byl K40 mutován za R40, se na první pohled nijak nelišily od wild typu (Xiong et al., 2013). Zdá se, že u této rostliny je lyzin na pozici 40 důležitý převážně pro své strukturní vlastnosti. Jeho výměna za Q40, který mimikuje acetyl, vedla ke vzniku trpasličích mutant, jež měly problém s dělením a buněčnou expanzí (Xiong et al., 2013). Zajímavé je, že tyto Q40 mutanty měly úplně narušené kortikální

mikrotubuly v děložních lístcích a hypokotylu, což jsou místa, kde se acetylace přirozeně vyskytuje v menší míře (Nakagawa et al., 2013b; Xiong et al., 2013).

Význam regulovatelné acetylace u rostlin možná spočívá více v odpovědi na vnější podněty. U dvou zástupců jednoděložných byla míra acetylace mikrotubulů korelována se způsobem, jakým reagovaly na bisfenol A (Adamakis et al., 2019). V sóje zase došlo k nárůstu acetylace mikrotubulů po působení kadmia, ovšem jen u některých izotypů (Gzyl et al., 2015). K nárůstu acetylace v buňkách kukuřice dochází po působení giberelinů. Tyto mikrotubuly jsou pak stabilnější vůči chladu (Huang a Lloyd, 1999). V borovici lesní (*Pinus sylvestris*) byla acetylace tubulinu ovlivněna siderofory, což jsou molekuly chelatující železo (Mucha et al., 2019). V případě, že byly do buněk vpraveny siderofory již s navázaným železem, došlo k nárůstu acetylace, v opačném případě byla acetylace tubulinu snížena. Tyto siderofory též podle toho, zda vázaly železo, odlišně reorganizovaly mikrotubuly. Acetylace byla dále korelována se stabilitou kortikálních mikrotubulů během působení šestimocného chromu na pět zástupců bobovitých (*Fabaceae*; Eleftheriou et al., 2016).

V rostlinách je při působení stresu indukována autofagie. V huseníčku bylo pomocí histochemických metod pozorováno zvýšení podílu acetylovaných mikrotubulů při stresu indukujícím autofagii (Lytvyn et al., 2018; Olenieva et al., 2019). Během stresu se acetylované mikrotubuly objevily i v kořenové špičce, kde se jinak nevyskytují (Lytvyn et al., 2018; Nakagawa et al., 2013a). Korelace autofagie a acetylace tubulinu byla již dříve pozorována v živočišných buňkách (Geeraert et al., 2010). V živočiších bylo také dokázáno, že acetylované mikrotubuly umožňují fúzi autozomů s lysozomy (Xie et al., 2010).

Acetylace tubulinu může být též využita patogeny jako zbraň proti hostiteli. Rostlinný patogen *Pseudomonas syringae* (gram-negativní bakterie) produkuje protein HopZ1a z rodiny sekretovaných efektorů typu III, který slouží k prolomení rostlinné obrany. Bylo prokázáno, že HopZ1a acetyluje tubulin (Lee et al., 2012). Mezi účinky HopZ1a patří narušení kortikálních mikrotubulů, zásah do sekretorické dráhy a blokování depozice kalóзовé zátky. Není však jasné, zda jsou tyto účinky důsledkem acetylace tubulinu (Lee et al., 2012). Bakterie *Yersinia pestis* napadající živočichy, produkuje příbuzný protein YopJ, který má též schopnost acetylovat lysin (Mittal et al., 2010). Jeho asociace s tubulinem zatím nebyla prokázána. Podobný jev, kdy patogeny ovlivňují acetylační status tubulinu ve prospěch úspěšné infekce, byl pozorován u několika lidských virů, např. u HIV (Sabo et al., 2013).

Acetylace je tedy značně rozšířenou posttranslační modifikací, jež dokáže přímo ovlivnit dynamiku mikrotubulů. Acetylace K40 stabilizuje mikrotubuly, zatímco acetylace K252 působí opačně. Role acetylace se u rostlin a živočichů mírně liší. V obou systémech ale platí, že i když není nepostradatelná, přináší konkurenční výhodu, neboť umožňuje reagovat na vnější podmínky. Zároveň však acetylace může být zneužita patogeny ve vlastní prospěch.

### 3.2. Fosforylace

Tubulin, včetně rostlinného, může být fosforylován na serinu, threoninu nebo tyrozinu (shrnutí v Blume, Lloyd a Yemets, 2008). V HeLa buňkách bylo nalezeno 22 fosforylovatelných míst na  $\alpha$ -tubulinu a 24 míst na  $\beta$ -tubulinu. To je zatím nejvíce, co bylo zjištěno pro jakoukoli tubulinovou modifikaci. Většina z těchto fosforylací má v HeLa buňkách destabilizující vliv na mikrotubuly (Liu et al., 2015).

V živočišných již bylo zkoumáno množství fosforylovaných míst (shrnutí v Janke a Magiera, 2020). Zde ve zkratce představím dvě z nich. Prvním je fosforylace S172 v  $\beta$ -tubulinu pomocí cyklin dependentní kinázy 1 nebo kinázy DYRK1a/MNB (dual-specificity tyrosine regulated kinase 1a/Minibrain; Fourest-Lieuvin et al., 2006; Ori-McKenney et al., 2016). Takto modifikovaný tubulin se v živočišných buňkách s mnohem nižší účinností váže do mikrotubulu (Fourest-Lieuvin et al., 2006; Ori-McKenney et al., 2016). Druhým je fosforylace S444 na C-konci  $\beta$ -tubulinu pomocí kaseinkinázy 2 $\alpha$  (CK2 $\alpha$ ; Sgrò et al., 2016). Tato modifikace se vyskytuje pouze v obratlových tubulinech třídy  $\beta$ III, neboť jiné izotypy serin v této pozici nekódují (shrnutí v Ludueña, 2013). Na rozdíl od většiny fosforylací má fosforylace S444 stabilizující vliv na mikrotubuly a je důležitá pro správný průběh mitózy (Sgrò et al., 2016). Překvapivě zatím nejsou v živočišných známy enzymy, které zprostředkovávají defosforylaci.

#### 3.2.1. Fosforylace v rostlinách

I v rostlinných tubulinech bylo objeveno mnoho potenciálně fosforylovatelných míst (Durek et al., 2010), byť většina z nich zatím nebyla potvrzena. Tubuliny huseníčku a rýže jsou fosforylovány na T349  $\alpha$ -tubulinu pomocí PSH1 (propyzamide-hypersenzitivní 1), což je enzym s tubulinkinázovou i proteinfosfatázovou aktivitou (Ban et al., 2013; Fujita et al., 2013). Kinázová aktivita je za normálních podmínek potlačena, během osmotického stresu se však kináza rychle aktivuje a fosforyluje tubulin (Fujita et al., 2013). T349 se nachází na rozhraní mezi sousedními dimery tubulinu a jeho fosforylace významně snižuje efektivitu zabudování takto modifikovaného dimeru do mikrotubulu (Ban et al., 2013; Fujita et al., 2013).

V tabákové buněčné kultuře byla pomocí imunochemických metod identifikována na obou tubulinech fosforylace tyrozinu (Blume et al., 2008a). Identita fosforylovaných míst nebyla zjištěna. Dle *in silico* modelu by fosforylace Y262  $\alpha$ -tubulinu a Y107  $\beta$ -tubulinu mohla stabilizovat interakci s kinesinem-8 (Demchuk et al., 2019). Zda jsou tyto aminokyseliny doopravdy modifikovány *in vivo* zatím není známo.

Další zmínky o fosforylaci rostlinných tubulinů pochází z *in vitro* experimentů. Pět konzervovaných míst napříč  $\beta$ -tubulinem může být fosforylováno pomocí enzymu NEK6 (NIMA related kinase 6), což má opět za následek destabilizaci mikrotubulů (Takatani et al., 2017). Jedním z nich je T166, jehož fosforylace byla již dříve uvedena v rostlinné databázi

fosfoproteinů (Durek et al., 2010). Další fosforylaci tubulinu *in vitro* (konkrétně na S413 a S420  $\beta$ -tubulinu) zprostředkovává CKL6 (casein kinase 1-like 6; Ben-Nissan *et al.*, 2008).

Po aplikaci inhibitorů proteinkináz a proteinfosfatáz dochází ke změnám orientace mikrotubulů a abnormalitám růstu, což podtrhuje význam fosforylace pro správnou funkci mikrotubulů (Karpov et al., 2019; Yemets et al., 2008). Tento důkaz je však nepřímý, jelikož v rostlinách jsou fosforylovány i další proteiny asociované s mikrotubuly (Durek et al., 2010).

O enzymech defosforylujících rostlinný tubulin (tj. tubulinfosfatázách) se toho zatím moc neví. Jedním z nich by mohla být fosfatáza 2A (PP2A) z rodiny serin/threonin fosfatáz (Awotunde *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2012). Podjednotka A2 této fosfatázy je schopna vázat tubulin deacetylázu HDAC14 (Tran et al., 2012). Dokonce bylo navrženo, že by HDAC14 mohla navádět PP2A k mikrotubulu (Tran et al., 2012). Nabízí se tak možnost, že deacetylace a defosforylace tubulinu jsou v rostlinách navzájem provázány.

### 3.3. Tyrozinační cyklus

Většina  $\alpha$ -tubulinů je kódována s tyrozinem na C-konci. Ten může být enzymaticky odstraněn karboxypeptidázou a opět přidán tubulintyrozinligázou (TTL), čímž dochází k tubulinovému tyrozinačnímu cyklu.

TTL má za substrát pouze volné tubulinové dimery. Po polymeraci se konformace tubulinu změní, čímž je zabráněno přístupu TTL (Prota et al., 2013). Naopak k detyrozinaci dochází preferenčně v mikrotubulu (Aillaud et al., 2017). Zprostředkovává ji komplex vasohibin/SVBP (small vasohibin-binding protein), který byl původně zkoumán v souvislosti s angiogenezí (Aillaud et al., 2017; Nieuwenhuis et al., 2017). Blízké homology výše uvedených enzymů zatím nebyly u rostlin nalezeny (Gardiner, 2019). Rostliny si tedy pro reverzibilní tyrozinaci musely vyvinout vlastní enzymatický aparát.

Pro detyrozinované mikrotubuly v živočiších je charakteristická zvýšená stabilita, zatímco dynamické populace mikrotubulů bývají tyrozinované (Webster et al., 1987). Nepřímé důkazy rychlejšího obratu tyrozinovaných mikrotubulů byly pozorovány i u rostlin (Jovanović et al., 2010; Schneider et al., 2015). *In vitro* mají živočišné mikrotubuly stejnou dynamiku bez ohledu na svůj tyrozinační status (Skoufias a Wilson, 1998). To značí, že tato modifikace především ovlivňuje interakci s MAPs. Tyrozinované mikrotubuly slouží v myších embryonálních fibroblastech jako lepší substrát pro destabilizující kinesin MCAK (mitotic centromere-associated kinesin) z rodiny kinesinů-13 (Peris et al., 2009). Oproti tomu na detyrozinovaných mikrotubulech je *in vitro* inhibována aktivita depolymerizujícího motoru KIF2A ze stejné rodiny (Peris et al., 2009).

Tyrozinačního cyklu je také využito pro cílení transportu. Plus-vazebné proteiny s CAP-Gly doménou (např. CLIP-170 a podjednotka dynein/dynactin komplexu p150 Glued) rozpoznávají EEY motiv tyrozinovaného tubulinu (Peris et al., 2006). Rostliny však pravděpodobně žádný protein s CAP-Gly doménou nekódují (Bisgrove et al., 2004). Motor KIF5 (izoforma

kinesinu-1) se *in vitro* i v savčích buňkách lépe pohybuje po detyrozinovaných mikrotubulech (Dunn et al., 2008).

V mitóze hrají roli oba tyrozinační stavy tubulinu. CENP-E (centromere-associated protein E), což je motor transportující chromozomy do ekvatoriální roviny, má preferenci pro detyrozinované mikrotubuly (Barisic et al., 2015). Naopak transport chromozomů pomocí dynein/dynactin komplexu vyžaduje C-koncový tyrozin, který je rozpoznáván podjednotkou p150glued s CAP-Gly doménou (McKenney et al., 2016).

Tyrozínace tubulinu je u živočichů nezbytná pro život. Myši s umlčenou TTL umírají během perinatálního období, pravděpodobně na následky chybné organizace mikrotubulů v mozku (Erck et al., 2005). Nedávno bylo objeveno, že v příčně pruhované svalovině je detyrozínace důležitá pro interakci mikrotubulů s desminem, což je protein tvořící intermediální filamenta (Robison et al., 2016). Krom toho ve svaích detyrozinované mikrotubuly zprostředkovávají signalizaci pomocí reaktivních forem kyslíku (Kerr et al., 2015). Dohromady tak míra detyrozínace určuje rigiditu myocytů, což při nadměrné detyrozínaci může vést až k mechanickému poškození svalu (Kerr et al., 2015; Robison et al., 2016).

V některých organismech dochází k enzymatickému odstranění koncového glutamátu  $\alpha$ -tubulinu za vzniku  $\Delta 2$ -tubulinu nebo  $\Delta 3$ -tubulinu (Aillaud et al., 2016; Paturle-Lafanechère et al., 1991). V jednom izotypu  $\beta$ -tubulinu byl stejný motiv nalezen po odstranění 4 koncových aminokyselin (Aillaud et al., 2016). Takovéto tubuliny již nemohou být tyrozinovány, jelikož vazebné místo TTL nerozpozná jejich sekvenci (Prota et al., 2013).

### 3.3.1 Tyrozinační cyklus v rostlinách

Všechny známé  $\alpha$ -tubulinové izotypy huseníčku, kukuřice i lnu kódují terminální tyrozin (Kopczak et al., 1992; Pydiura et al., 2019; Villemur et al., 1992). Oproti tomu pouze 3 z 8  $\alpha$ -tubulinů vrby korejanky (*Salix arbutifolia*) a topolu osikového mají jako poslední aminokyselinu tyrozin. U zbylých izotypů za tyrozinem následuje buď leucin, methionin, glutamát nebo glutamin (Oakley et al., 2007; Rao et al., 2016). Zda mohou být tyto koncové aminokyseliny odstraněny a jejich izotypy zahrnuty do tyrozinačního cyklu, zatím není známo.

V živočiších bývají  $\alpha$ -tubuliny zakončeny EEY motivem (shrnutí v Ludueña, 2013). Oproti tomu v rostlinných  $\alpha$ -tubulinech někdy tyrozinu předchází místo glutamátu aspartát (Kopczak et al., 1992; Oakley et al., 2007; Rao et al., 2016; Villemur et al., 1992). Živočišná TTL takovéto konce nerozpoznává (Prota et al., 2013). Zda rostliny kódují enzym schopný tento motiv detyrozinovat, zůstává záhadou.

Detyrozinovaný tubulin byl imunochemicky identifikován v několika pletivech kukuřice, bavlníku a v buňkách tabáku a hrachu setého (*Pisum sativum*; Dixon et al., 2000; Duckett a Lloyd, 1994; Smertenko et al., 1997; Wang et al., 2004). Naopak nebyl objeven v kořeni a pylu kukuřice a v buňkách kořenové špičky cibule (*Allium cepa*) a borovice montereyské (*Pinus radiata*; Gilmer et al., 1999b; Wang et al., 2004). V purifikovaném tubulinu z buněk huseníčku



se jej nepodařilo identifikovat ani pomocí hmotnostní spektrometrie (Hotta et al., 2016). Ve všech výše zmíněných studiích tvořily detyrozinované tubuliny minoritu, byly-li vůbec nalezeny.

Detyrozinace rostlinných mikrotubulů reaguje na fytohormony. V hrachu byl jeden izotyp detyrozinován po aplikaci giberelinů, což bylo korelováno se sníženou senzitivitou mikrotubulů vůči chladu (Duckett a Lloyd, 1994). V koleoptile kukuřice vzrostl po odstranění auxinu podíl detyrozinovaného tubulinu a kortikální mikrotubuly změnilly orientaci z transverzální na longitudinální (Wiesler et al., 2002). Zatímco transverzální orientaci zaujímal tyrozinované i detyrozinované mikrotubuly, longitudinální mikrotubuly byly tvořeny téměř výhradně detyrozinovaným tubulinem. Po aplikaci auxinu podíl detyrozinovaného tubulinu opět klesl (Wiesler et al., 2002).

Aplikace partenolidu (seskviterpen z řimbaby obecné, *Tanacetum parthenium*, sloužící jako inhibitor zatím neidentifikované tubulindetyrozinázy) na buňky tabákové kultury vedla k inhibici buněčného dělení (Schneider et al., 2015). Při nižších koncentracích působil partenolid dezorganizaci kortikálních mikrotubulů spojenou se ztrátou buněčné polaridy (Schneider et al., 2015). Ve stejné studii bylo objeveno, že kinezin KCH z rodiny kinezinů-14 ochotněji váže tyrozinované mikrotubuly, což je zatím jediný potvrzený případ preferenční interakce MAPs s modifikovaným tubulinem v rostlinách. Jelikož KCH ovlivňuje buněčné dělení a elongaci, tyrozinační status mikrotubulů by mohl mít vliv na morfogenezi rostlinných buněk (Schneider et al., 2015). *In silico* 3D modelování komplexu tubulinu a kinezinu-8 naznačilo, že i on se k tyrozinovaným mikrotubulům ochotněji váže (Blume et al., 2013).

Inkorporace nitrotyrozinu ( $NO_2$ Tyr) měla na buněčné dělení a orientaci mikrotubulů podobný vliv jako partenolid (Jovanović et al., 2010). Nitrotyrozin nemůže být enzymaticky odstraněn a proto snižuje podíl detyrozinovaného tubulinu (Jovanović et al., 2010). V této studii se však nepodařilo jasně prokázat, zda za pozorovaný efekt zodpovídá snížení detyrozinace nebo vlastní působení nitrotyrozinu. To, že je zabudování nitrotyrozinu na C-konec tubulinu nevratné, bylo navíc zpochybněno jak v rostlinách, tak v živočiších (Bisig et al., 2002; Blume et al., 2013). I z toho důvodu bylo navrženo, že by nitrotyrozinace mohla představovat další samostatnou posttranslační modifikaci se schopností regulovat vlastnosti tubulinu (Blume et al., 2013).

$\Delta 2$ -tubulin byl prozatím imunochemicky nalezen pouze v tabákové buněčné kultuře, kde se jeho lokalizace podobala detyrozinovanému tubulinu (Smertenko et al., 1997). Jiné důkazy výskytu  $\Delta 2$ -tubulinu v rostlinách zatím nebyly publikovány.

### 3.4. Polyglutamylace a polyglycylace

(Poly)glutamylací tubulinu se rozumí připojení jednoho či více glutamátů izopeptidovou vazbou na glutamátový zbytek C-konce tubulinu (Eddé et al., 1990). Při (poly)glycylaci je na glutamát připojen glycin (Redeker et al., 1994). Takto může být modifikováno hned několik

glutamátových zbytků na  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubulinu (Redeker et al., 1998; Vinh et al., 1999). U živočichů je glutamylace typická pro mikrotubuly dělicího vřeténka, centriol a axonem bičků a cilií (Bobinnec et al., 1998; Fouquet et al., 1994). V savcích je glutamylace nejhojnější v neuronech (Wolff et al., 1992). Glycylované mikrotubuly se nachází především v axonech cilií a bičků (Bré et al., 1996; Mary et al., 1996).

Oproti dříve zmíněným modifikacím mohou polyglutamylace a polyglycylace tvořit na tubulinu různě dlouhé řetězce, čímž mohou zajistit jemnější regulaci, například interakce s MAPs (Redeker et al., 1994). Pro ilustraci možné variability lze zmínit, že v prvocích byly pozorovány tubuliny, které měly na C-koncích navázány až desítky glutamátových nebo glycylových zbytků, běžněji jsou však řetězce kratší (Schneider et al., 1998; Wall et al., 2016).

Polyglycylace a polyglutamylace jsou zprostředkovávány velikou rodinou TTLL enzymů (tubulin tyrosine ligase-like), jejichž katalytický mechanismus je podobný TTL (Janke et al., 2005; Prota et al., 2013). Na rozdíl od TTL mají TTLL preferenci pro polymerizované mikrotubuly, jelikož se liší způsob, jakým se vážou na tubulin (Garnham et al., 2015). V savcích se nachází 13 členů TTLL rodiny (shrnuto v Yu et al., 2015). Obecně se dělí podle substrátu na glutamylázy a glycylázy. Jednotlivé skupiny mohou být dále rozděleny na iniciační enzymy, které vytvářejí místa větvení a elongační, které řetězec prodlužují (van Dijk et al., 2007). Jednotlivé enzymy se také liší preferencí pro  $\alpha$ - či  $\beta$ -tubulin, i když při nadměrné expresi dovedou některé modifikovat oba tubuliny (van Dijk et al., 2007; Rogowski et al., 2009). Některé TTLL kromě tubulinu modifikují i další proteiny (Van Dijk et al., 2008; Xia et al., 2016; Xiong et al., 2020).

Zpětnou deglutamylační či deglycylační reakci zprostředkovávají cytosolické karboxypeptidázy CCP-1 až -6 z rodiny metalopeptidáz M14 (Rogowski et al., 2010; Tort et al., 2014). I tyto enzymy mohou mít více substrátů (Rogowski et al., 2010; Xia et al., 2016; Ye et al., 2014). Enzymy z této rodiny též zodpovídají za odstranění koncového glutamátu při vzniku  $\Delta 2$ -tubulinu (Rogowski et al., 2010). O deglycylačních enzymech se toho ví méně. Zatím byla tato aktivita prokázána jen u dvou enzymů z rodiny metalopeptidáz M20C v lamblii střevní (*Giardia duodenalis*), které deglycylují protein 14-3-3 a možná i tubulin (Lalle et al., 2011).

Zdá se, že glutamylační a glycylační enzymy spolu kompetují o substrát, pravděpodobně protože modifikují stejná místa nebo si stericky brání v přístupu (Wloga et al., 2009). Myši s mutovanou glycylázou mají nadměrně glutamylované mikrotubuly, což svědčí pro kompetici těchto modifikací (Grau et al., 2017).

V živočiších bylo prokázáno, že glutamylace i glycylace ovlivňují interakci s MAPs. Glutamylované mikrotubuly jsou preferenčním substrátem kataninu a spastinu, což jsou proteiny štěpící mikrotubuly (Lacroix et al., 2010; Shin et al., 2019). *In vitro* roste aktivita spastinu z octomilky pouze do určité úrovně glutamylace, po překročení této hranice má další nárůst glutamylace inhibiční efekt (Valenstein a Roll-Mecak, 2016). Afinity spastinu pro mikrotubulus však roste nadále, takže nadměrně polyglutamylované mikrotubuly mohou fungovat jako sink spastinu a zamezit tak štěpení méně glutamylovaných mikrotubulů ve svém okolí (Valenstein

a Roll-Mecak, 2016). Podobně stupeň glutamylace ovlivňuje savčí MAPs tau, MAP1A, MAP1B a MAP2 (Bonnet et al., 2001; Boucher et al., 1994).

Glutamylace také reguluje transport díky preferenci některých motorů pro polyglutamylované mikrotubuly. Příkladem takových motorů jsou lidský kinesin-1, kinesin-2 z háďátka a savčí kinesin-3 (Lessard et al., 2019; Sirajuddin et al., 2014).

V živočišných modelech je ztráta nebo umlčení glutamylačních enzymů často spojována se ztrátou motility cílů nebo jejich poruchami (Bosch Grau et al., 2013; Ikegami et al., 2010; Konno et al., 2016; Suryavanshi et al., 2010). V nálevníku *Tetrahymena thermophila* je glutamylace také důležitá pro maturaci bazálních tělísek, ze kterých axonemy vyrůstají (Wloga et al., 2008). Oproti tomu glycylation má vliv na stabilitu axonem (Bosch Grau et al., 2013; Rocha et al., 2014). V případě octomilky po umlčení tubulinglycylázy TTLL3 dochází k téměř úplné samčí sterilitě spojené s nestabilními axonemami (Rogowski et al., 2009). V daniu pruhovaném (*Danio rerio*) se funkce glutamylace a glycylation v cílech nejspíš částečně překrývají (Pathak et al., 2011).

### 3.4.1 Polyglutamylace a polyglycylation v rostlinách

Polyglutamylace byla nalezena v axonemách zelených řas *Ch. reinhardtii* a *Spermatozopsis similis* (Lehtreck a Geimer, 2000). U *Ch. reinhardtii* interagují dlouhé polyglutamylované řetězce s vnitřním ramenem dyneinu, což je důležité pro motilitu jejich bičíků (Kubo et al., 2010). Interakce glutamylovaných mikrotubulů axonem a vnitřního ramene dyneinu byla pozorována také u *T. thermophila* (Suryavanshi et al., 2010).

V krytosemenných rostlinách je zmínka o polyglutamylaci poskrovnu. Glutamylovaný tubulin byl imunochemicky nalezen v listech kukuřice pomocí protilátky GT335 proti savčímu glutamylovanému tubulinu (Wang et al., 2004). Protilátka GT335 také značila  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulin v tabákové kultuře VBI-0 (Smertenko et al., 1997). Ta samá protilátka ovšem v jiné buněčné linii tabáku (BY-2) s tubulinem nereagovala (Hotta et al., 2016). Glutamylovaný tubulin nebyl nalezen ani v buněčné kultuře huseníčku, a to ani za použití hmotnostní spektrometrie (Hotta et al., 2016). Glycylation nebyla u rostlin identifikována vůbec.

Vyšší rostliny nekódují TTLL ani CCP enzymy s výjimkou homologů TTLL12 (Gardiner, 2019). Rodina TTLL12 představuje atypickou, málo charakterizovanou skupinu, která nevykazuje glutamylační, glycylation ani tyrozinační aktivitu (Brants et al., 2012; Garnham a Roll-Mecak, 2012; Rogowski et al., 2009). Místo toho bylo navrženo, že figuruje v neenzymatické regulaci posttranslačních modifikací (Brants et al., 2012).

Je nápadné, že polyglutamylace a polyglycylation jsou důležité v obrvených a bičíkatých organismech. V rostlinách se bičíky naposledy vyskytují v spermatozoidech cykasů a jinanů (shrnuto v Hackenberg a Twell, 2019). Nabízí se tedy, že vyšší rostliny spolu s bičíky ztratily i potřebu této posttranslační modifikace.

## 4. Závěr

V dnešní době je všeobecně uznáváno, že tubulinový kód existuje. Lze si těžko představit, že by organismy vynakládaly tolik úsilí na syntézu odlišných izotypů a tvorbu posttranslačních modifikací, kdyby z toho pro ně neplynul užitek.

V živočiších pomalu začínají být složky tubulinového kódu rozklíčovány. Zatím však ani v nejprozkoumanějších organismech nemůžeme tvrdit, že známe všechny principy, jakými tento kód funguje. Mezi nezodpovězené otázky patří, jak moc se liší modifikace jednotlivých izotypů, a zda stejná modifikace v různých izotypech nemůže vést k odlišným výsledkům. Dále by bylo zajímavé zjistit, zda různé kombinace modifikací nebo izotypů v jednom mikrotubulu mohou zapříčinit vznik nových vlastností, které se nedají vysvětlit pouze aditivním vlivem jednotlivých komponent. Nadále také bude důležité zkoumat enzymy, které posttranslační modifikace vytváří a proteiny, které je rozpoznávají.

V rostlinách je výzkum tubulinového kódu teprve v počátcích, přesto byly za poslední roky udělány značné pokroky. U několika rostlinných zástupců již byla charakterizována exprese tubulinových izotypů v jednotlivých orgánech a stádiích vývoje. V rostlinných tubulinech bylo také nalezeno téměř celé spektrum posttranslačních modifikací známých z živočichů. Nyní bude podstatné zjistit, jaké enzymy rostlinný tubulin modifikují a jaké proteiny s takto modifikovaným tubulinem interagují. První slibný krok v tomto směru byl již vykonán, když byla objevena preference kinezinu KCH pro tyrozinovaný tubulin.

Přes všechny zbývající nejasnosti se zdá, že tubulinový kód zajišťuje jemnou regulaci funkce mikrotubulů, převážně ve specializovaných buňkách organismů. Výhoda této regulace se často může projevit až během delšího časového období, proto nejspíš není funkce tubulinového kódu tolik zřetelná na úrovni jednobuněčných organismů nebo buněčných kultur. V mnohobuněčných organismech, včetně rostlin, má však výzkum tubulinového kódu potenciál značně rozšířit naše povědomí o principu fungování mikrotubulárního cytoskeletu.

## Seznam použité literatury

Abdrakhamanova, A., Wang, Q.Y., Khokhlova, L., a Nick, P. (2003). Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? *Plant Cell Physiol.* 44, 676–686.

Adamakis, I.-D.S., Panteris, E., a Eleftheriou, E.P. (2019). Tubulin acetylation mediates bisphenol A effects on the microtubule arrays of *Allium cepa* and *Triticum turgidum*. *Biomolecules* 9, 185.

Aguilar, A., Becker, L., Tedeschi, T., Heller, S., Iomini, C., a Nachury, M. V. (2014).  $\alpha$ -tubulin K40 acetylation is required for contact inhibition of proliferation and cell-substrate adhesion. *Mol. Biol. Cell* 25, 1854–1866.

Aillaud, C., Bosc, C., Saoudi, Y., Denariera, E., Peris, L., Sago, L., Taulet, N., Cieren, A., Tort, O., Magiera, M.M., et al. (2016). Evidence for new C-terminally truncated variants of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulins. *Mol. Biol. Cell* 27, 640–653.

Aillaud, C., Bosc, C., Peris, L., Bosson, A., Heemeryck, P., Van Dijk, J., Le Fric, J., Boulan, B., Vossier, F., Sanman, L.E., et al. (2017). Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. *Science* (80-. ). 358, 1448–1453.

Akella, J.S., Wloga, D., Kim, J., Starostina, N.G., Lyons-Abbott, S., Morrisette, N.S., Dougan, S.T., Kipreos, E.T., a Gaertig, J. (2010). MEC-17 is an  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase. *Nature* 467, 218–222.

Akhmanova, A., a Steinmetz, M.O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: Two ends in the limelight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 711–726.

Akhmanova, A., a Steinmetz, M.O. (2019). Microtubule minus-end regulation at a glance. *J. Cell Sci.* 132.

Alper, J.D., Decker, F., Agana, B., a Howard, J. (2014). The motility of axonemal dynein is regulated by the tubulin code. *Biophys. J.* 107, 2872–2880.

Alushin, G.M., Lander, G.C., Kellogg, E.H., Zhang, R., Baker, D., a Nogales, E. (2014). High-Resolution microtubule structures reveal the structural transitions in  $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell* 157, 1117–1129.

Awotunde, O.S., Lechward, K., Krajewska, K., Zolnierowicz, S., a Muszyńska, G. (2003). Interaction of maize (*Zea mays*) protein phosphatase 2A with tubulin. *Acta Biochim. Pol.* 50, 131–138.

Ban, Y., Kobayashi, Y., Hara, T., Hamada, T., Hashimoto, T., Takeda, S., a Hattori, T. (2013).  $\alpha$ -tubulin is rapidly phosphorylated in response to hyperosmotic stress in rice and arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 54, 848–858.

Barisic, M., Silva E Sousa, R., Tripathy, S.K., Magiera, M.M., Zaytsev, A. V., Pereira, A.L., Janke, C., Grishchuk, E.L., a Maiato, H. (2015). Microtubule deetyrosination guides chromosomes during mitosis. *Science* (80-. ). 348, 799–803.

Ben-Nissan, G., Cui, W., Kim, D.J., Yang, Y., Yoo, B.C., a Lee, J.Y. (2008). Arabidopsis casein kinase 1-like 6 contains a microtubule-binding domain and affects the organization of cortical microtubules. *Plant Physiol.* 148, 1897–1907.

Bisgrove, S.R., Hable, W.E., a Kropf, D.L. (2004). +TIPs and microtubule regulation. The beginning of the plus end in plants. *Plant Physiol.* 136, 3855–3863.

Bisig, C.G., Purro, S.A., Contín, M.A., Barra, H.S., a Arce, C.A. (2002). Incorporation of 3-nitrotyrosine into the C-terminus of  $\alpha$ -tubulin is reversible and not detrimental to dividing cells. *Eur. J. Biochem.* 269, 5037–5045.

Blume, Y., Yemets, A., Sulimenko, V., Sulimenko, T., Chan, J., Lloyd, C., a Dráber, P. (2008a).

Tyrosine phosphorylation of plant tubulin. *Planta* 229, 143–150.

Blume, Y.B., Lloyd, C.W., a Yemets, A.I. (2008b). Plant tubulin phosphorylation and its role in cell cycle progression. In *The plant cytoskeleton: a key tool for agro-biotechnology*. NATO Science for peace and security series C: Environmental security, Y.B. Blume, W.V. Baird, A.I. Yemets, a D. Breviario, ed. (Springer, Dordrecht), s. 145–159.

Blume, Y.B., Krasylenko, Y.A., Demchuk, O.M., a Yemets, A.I. (2013). Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plant cells. *Front. Plant Sci.* 4, 530.

Bobinnec, Y., Moudjou, M., Fouquet, J.P., Desbruyères, E., Eddé, B., a Bornens, M. (1998). Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 39, 223–232.

Bond, J.F., Fridovich-Keil, J.L., Pillus, L., Mulligan, R.C., a Solomon, F. (1986). A chicken-yeast chimeric  $\beta$ -tubulin protein is incorporated into mouse microtubules in vivo. *Cell* 44, 461–468.

Bonnet, C., Boucher, D., Lazereg, S., Pedrotti, B., Islam, K., Denoulet, P., a Larcher, J.C. (2001). Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *J. Biol. Chem.* 276, 12839–12848.

Bosch Grau, M., Curto, G.G., Rocha, C., Magiera, M.M., Sousa, P.M., Giordano, T., Spassky, N., a Janke, C. (2013). Tubulin glycylation and glutamylases have distinct functions in stabilization and motility of endymal cilia. *J. Cell Biol.* 202, 441–451.

Boucher, D., Larcher, J.C., Gros, F., a Denoulet, P. (1994). Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein tau and Tubulin. *Biochemistry* 33, 12471–12477.

Brants, J., Semenchenko, K., Wasylyk, C., Robert, A., Carles, A., Zambrano, A., Pradeau-Aubreton, K., Birck, C., Schalken, J.A., Poch, O., et al. (2012). Tubulin tyrosine ligase like 12, a TTL family member with SET- and TTL-like domains and roles in histone and tubulin modifications and mitosis. *PLoS One* 7, e51258.

Bré, M.H., Redeker, V., Quibell, M., Darmanaden-Delorme, J., Bressac, C., Cosson, J., Huitorel, P., Schmitter, J.M., Rossier, J., Johnson, T., et al. (1996). Axonemal tubulin polyglycylation probed with two monoclonal antibodies: Widespread evolutionary distribution, appearance during spermatozoan maturation and possible function in motility. *J. Cell Sci.* 109, 727–738.

Breviario, D., Giani, S., a Morello, L. (2013). Multiple tubulins: Evolutionary aspects and biological implications. *Plant J.* 75, 202–218.

Brown, R.C., Lemmon, B., a Nguyen, H. (2002). The microtubule cycle during successive mitotic waves in the syncytial female gametophyte of ginkgo. *J. Plant Res.* 115, 491–494.

Buschmann, H., a Müller, S. (2019). Update on plant cytokinesis: rule and divide. *Curr. Opin. Plant Biol.* 52, 97–105.

Carpenter, J.L., Ploense, S.E., Snustad, D.P., a Silflow, C.D. (1992). Preferential expression of an  $\alpha$ -tubulin gene of arabidopsis in pollen. *Plant Cell* 4, 557–571.

Castro-Castro, A., Janke, C., Montagnac, G., Paul-Gilloteaux, P., a Chavrier, P. (2012). ATAT1/MEC-17 acetyltransferase and HDAC6 deacetylase control a balance of acetylation of alpha-tubulin and cortactin and regulate MT1-MMP trafficking and breast tumor cell invasion. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 950–960.

Cheng, Z., Snustad, D.P., a Carter, J. V. (2001). Temporal and spatial expression patterns of TUB9, a  $\beta$ -tubulin gene of Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.* 47, 389–398.

Chu, B., Snustad, D.P., a Carter, J. V. (1993). Alteration of beta-tubulin gene expression during low-temperature exposure in leaves of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* 103, 371–377.

- Chu, B., Wilson, T.J., McCune-Zierath, C., Snustad, D.P., a Carter, J. V (1998). Two beta-tubulin genes, TUB1 and TUB8, of Arabidopsis exhibit largely nonoverlapping patterns of expression. *Plant Mol. Biol.* 37, 785–790.
- Chu, C.W., Hou, F., Zhang, J., Phu, L., Loktev, A. V., Kirkpatrick, D.S., Jackson, P.K., Zhao, Y., a Zou, H. (2011). A novel acetylation of  $\beta$ -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Mol. Biol. Cell* 22, 448–456.
- Coombes, C., Yamamoto, A., McClellan, M., Reid, T.A., Plooster, M., Luxton, G.W.G., Alper, J., Howard, J., a Gardner, M.K. (2016). Mechanism of microtubule lumen entry for the  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase enzyme  $\alpha$ TAT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E7176–E7184.
- Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M.L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., et al. (2009). Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of  $\alpha$ -tubulin. *Cell* 136, 551–564.
- Cueva, J.G., Hsin, J., Huang, K.C., a Goodman, M.B. (2012). Posttranslational acetylation of  $\alpha$ -tubulin constrains protofilament number in native microtubules. *Curr. Biol.* 22, 1066–1074.
- Demchuk, O.M., Karpov, P.A., a Blume, Y.B. (2019). 3D-modeling of carboxyl-terminal phosphorylation of plant  $\alpha\beta$ -tubulin and its role in kinesin-8/microtubule interaction. *Cell Biol. Int.* 43, 1072–1080.
- van Dijk, J., Rogowski, K., Miro, J., Lacroix, B., Eddé, B., a Janke, C. (2007). A Targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation. *Mol. Cell* 26, 437–448.
- van Dijk, J., Miro, J., Strub, J.M., Lacroix, B., Van Dorsselaer, A., Edde, B., a Janke, C. (2008). Polyglutamylation is a post-translational modification with a broad range of substrates. *J. Biol. Chem.* 283, 3915–3922.
- Dixon, D.C., Seagull, R.W., a Triplett, B.A. (1994). Changes in the accumulation of alpha- and beta-tubulin isotypes during cotton fiber development. *Plant Physiol.* 105, 1347–1353.
- Dixon, D.C., Meredith, W.R., a Triplett, B.A. (2000). An assessment of  $\alpha$ -tubulin isotype modification in developing cotton fiber. *Int. J. Plant Sci.* 161, 63–67.
- Dompierre, J.P., Godin, J.D., Charrin, B.C., Cordelières, F.P., King, S.J., Humbert, S., a Saudou, F. (2007). Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington’s disease by increasing tubulin acetylation. *J. Neurosci.* 27, 3571–3583.
- Downing, K.H., a Nogales, E. (1998). Tubulin and microtubule structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 16–22.
- Del Duca, S., Bregoli, A.M., Bergamini, C., a Serafini-Fracassini, D. (1997). Transglutaminase-catalyzed modification of cytoskeletal proteins by polyamines during the germination of *Malus domestica* pollen. *Sex. Plant Reprod.* 10, 89–95.
- Duckett, C.M., a Lloyd, C.W. (1994). Gibberellic acid-induced microtubule reorientation in dwarf peas is accompanied by rapid modification of an  $\alpha$ -tubulin isotype. *Plant J.* 5, 363–372.
- Dunn, S., Morisson, E.E., Liverpool, T.B., Molina-París, C., Cross, R.A., Alonso, M.C., a Peckham, M. (2008). Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J. Cell Sci.* 121, 1085–1095.
- Durek, P., Schmidt, R., Heazlewood, J.L., Jones, A., MacLean, D., Nagel, A., Kersten, B., a Schulze, W.X. (2010). PhosPhAt: the Arabidopsis thaliana phosphorylation site database. An update. *Nucleic Acids Res.* 38, D828–D834.
- Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J.P., Desbruyères, E., Gros, F., a Denoulet, P. (1990). Posttranslational glutamylation of  $\alpha$ -tubulin. *Science* (80-. ). 247, 83–85.

- Eleftheriou, E.P., Adamakis, I.D.S., a Michalopoulou, V.A. (2016). Hexavalent chromium-induced differential disruption of cortical microtubules in some Fabaceae species is correlated with acetylation of  $\alpha$ -tubulin. *Protoplasma* 253, 531–542.
- Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A.D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C., et al. (2005). A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7853–7858.
- Eshun-Wilson, L., Zhang, R., Portran, D., Nachury, M. V., Toso, D.B., Löhr, T., Vendruscolo, M., Bonomi, M., Fraser, J.S., a Nogales, E. (2019). Effects of  $\alpha$ -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 10366–10371.
- Evrard, J.L., Nguyen, I., Bergdoll, M., Mutterer, J., Steinmetz, A., a Lambert, A.M. (2002). A novel pollen-specific  $\alpha$ -tubulin in sunflower: Structure and characterization. *Plant Mol. Biol.* 49, 611–620.
- Fosket, D.E., a Morejohn, L.C. (1992). Structural and functional organization of tubulin. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 201–240.
- Fouquet, J.-P., Kann, M.-L., Edde, B., Wolff, A., Desbruyeres, E., a Denoulet, P. (1994). Differential distribution of glutamylated tubulin during spermatogenesis in mammalian testis. *Cell Motil. Cytoskeleton* 27, 49–58.
- Fourest-Lieuvin, A., Peris, L., Gache, V., Garcia-Saez, I., Juillan-Binard, C., Lantéz, V., a Job, D. (2006). Microtubule regulation in mitosis: Tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol. Biol. Cell* 17, 1041–1050.
- Fridovich-Keil, J.L., Bond, J.F., a Solomon, F. (1987). Domains of beta-tubulin essential for conserved functions in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3792–3798.
- Fujita, S., Pytela, J., Hotta, T., Kato, T., Hamada, T., Akamatsu, R., Ishida, Y., Kutsuna, N., Hasezawa, S., Nomura, Y., et al. (2013). An atypical tubulin kinase mediates stress-induced microtubule depolymerization in arabidopsis. *Curr. Biol.* 23, 1969–1978.
- Fusco, C., Micale, L., Augello, B., Mandriani, B., Pellico, M.T., De Nittis, P., Calcagni, A., Monti, M., Cozzolino, F., Pucci, P., et al. (2014). HDAC6 mediates the acetylation of TRIM50. *Cell. Signal.* 26, 363–369.
- Gaertig, J., Cruz, M.A., Bowen, J., Gu, L., Pennock, D.G., a Gorovsky, M.A. (1995). Acetylation of lysine 40 in  $\alpha$ -tubulin is not essential in *Tetrahymena thermophila*. *J. Cell Biol.* 129, 1301–1310.
- Gardiner, J. (2019). Posttranslational modification of plant microtubules. *Plant Signal. Behav.* 14, e1654818.
- Garnham, C.P., a Roll-Mecak, A. (2012). The chemical complexity of cellular microtubules: Tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. *Cytoskeleton* 69, 442–463.
- Garnham, C.P., Vemu, A., Wilson-Kubalek, E.M., Yu, I., Szyk, A., Lander, G.C., Milligan, R.A., a Roll-Mecak, A. (2015). Multivalent microtubule recognition by tubulin tyrosine ligase-like family glutamylases. *Cell* 161, 1112–1123.
- Gavazzi, F., Pigna, G., Braglia, L., Giani, S., Breviario, D., a Morello, L. (2017). Evolutionary characterization and transcript profiling of  $\beta$ -tubulin genes in flax (*Linum usitatissimum* L.) during plant development. *BMC Plant Biol.* 17.
- Geeraert, C., Ratier, A., Pfisterer, S.G., Perdiz, D., Cantaloube, I., Rouault, A., Pattingre, S., Proikas-Cezanne, T., Codogno, P., a Poüs, C. (2010). Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. *J. Biol. Chem.* 285, 24184–24194.
- Giani, S., Qin, X., Faoro, F., a Breviario, D. (1998). In rice, Oryzalin and abscisic acid differentially affect tubulin mRNA and protein levels. *Planta* 205, 334–341.



- Giannoutsou, E., Galatis, B., Zachariadis, M., a Apostolakis, P. (2012). Formation of an endoplasmic reticulum ring associated with acetylated microtubules in the angiosperm preprophase band. *Cytoskeleton* 69, 252–265.
- Gilmer, S., Clay, P., MacRae, T.H., a Fowke, L.C. (1999a). Acetylated tubulin is found in all microtubule arrays of two species of pine. *Protoplasma* 207, 174–185.
- Gilmer, S., Clay, P., MacRae, T.H., a Fowke, L.C. (1999b). Tyrosinated, but not detyrosinated,  $\alpha$ -tubulin is present in root tip cells. *Protoplasma* 210, 92–98.
- Grau, M.B., Masson, C., Gadadhar, S., Rocha, C., Tort, O., Sousa, P.M., Vacher, S., Bieche, I., a Janke, C. (2017). Alterations in the balance of tubulin glycylation and glutamylation in photoreceptors leads to retinal degeneration. *J. Cell Sci.* 130, 938–949.
- Gzyl, J., Chmielowska-Bąk, J., Przymusiński, R., a Gwóźdź, E.A. (2015). Cadmium affects microtubule organization and post-translational modifications of tubulin in seedlings of soybean (*Glycine max* L.). *Front. Plant Sci.* 6, 937.
- Hackenberg, D., a Twell, D. (2019). The evolution and patterning of male gametophyte development. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Academic Press Inc.), s. 257–298.
- Han, I.S., Jongewaard, I., a Fosket, D.E. (1991). Limited expression of a diverged  $\beta$ -tubulin gene during soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) development. *Plant Mol. Biol.* 16, 225–234.
- Harper, J.F., a Mages, W. (1988). Organization and structure of *Volvox*  $\beta$ -tubulin genes. *Mol. Gen. Genet.* 213, 315–324.
- Hartl, M., Füßl, M., Boersema, P.J., Jost, J., Kramer, K., Bakirbas, A., Sindlinger, J., Plöckinger, M., Leister, D., Uhrig, G., et al. (2017). Lysine acetylome profiling uncovers novel histone deacetylase substrate proteins in *Arabidopsis*. *Mol. Syst. Biol.* 13, 949.
- He, X.-C., Qin, Y.-M., Xu, Y., Hu, C.-Y., a Zhu, Y.-X. (2008). Molecular cloning, expression profiling, and yeast complementation of 19  $\beta$ -tubulin cDNAs from developing cotton ovules. *J. Exp. Bot.* 59, 2687–2695.
- Hoffman, J.C., a Vaughn, K.C. (1995). Post-translational tubulin modifications in spermatogeneous cells of the pteridophyte *Ceratopteris richardii*. *Protoplasma* 186, 169–182.
- Honda, Y., Tsuchiya, K., Sumiyoshi, E., Haruta, N., a Sugimoto, A. (2017). Tubulin isotype substitution revealed that isotype combination modulates microtubule dynamics in *C. elegans* embryos.
- Hotta, T., Fujita, S., Uchimura, S., Noguchi, M., Demura, T., Muto, E., a Hashimoto, T. (2016). Affinity purification and characterization of functional tubulin from cell suspension cultures of *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Physiol.* 170, 1189–1205.
- Hoyle, H.D., a Raff, E.C. (1990). Two *Drosophila* beta tubulin isoforms are not functionally equivalent. *J. Cell Biol.* 111, 1009–1026.
- Hsu, W.W., Wu, B., a Liu, W.R. (2016). Sirtuins 1 and 2 Are Universal Histone Deacetylases. *ACS Chem. Biol.* 11, 792–799.
- Huang, R.F., a Lloyd, C.W. (1999). Gibberellic acid stabilises microtubules in maize suspension cells to cold and stimulates acetylation of  $\alpha$ -tubulin. *FEBS Lett.* 443, 317–320.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., a Yao, T.P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455–458.
- Hussey, P.J., Traas, J.A., Gull, K., a Lloyd, C.W. (1987). Isolation of cytoskeletons from synchronized plant cells: the interphase microtubule array utilizes multiple tubulin isotypes. *J. Cell Sci.* 88, 225–230.
- Ikegami, K., Sato, S., Nakamura, K., Ostrowski, L.E., a Setou, M. (2010). Tubulin polyglutamylation is

essential for airway ciliary function through the regulation of beating asymmetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10490–10495.

Ishiguro, K., Ando, T., Maeda, O., Watanabe, O., a Goto, H. (2014). Suppressive action of acetate on interleukin-8 production via tubulin- acetylation. *Immunol. Cell Biol.* 92, 624–630.

Jaffrey, S.R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C.D., Tempst, P., a Snyder, S.H. (2001). Protein S-nitrosylation: A physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat. Cell Biol.* 3, 193–197.

Janke, C., a Magiera, M.M. (2020). The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1–20.

Janke, C., Rogowski, K., Wloga, D., Regnard, C., Kajava, A. V., Strub, J.M., Temurak, N., Van Dijk, J., Boucher, D., Van Dorsselaer, A., et al. (2005). Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science* (80-. ). 308, 1758–1762.

Ji, S., Lu, Y., Li, J., Wei, G., Liang, X., a Zhu, Y. (2002). A  $\beta$ -tubulin-like cDNA expressed specifically in elongating cotton fibers induces longitudinal growth of fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 1245–1250.

Jost, W., Baur, A., Nick, P., Reski, R., a Gorr, G. (2004). A large plant beta-tubulin family with minimal C-terminal variation but differences in expression. *Gene* 340, 151–160.

Jovanović, A.M., Durst, S., a Nick, P. (2010). Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine. *J. Exp. Bot.* 61, 901–909.

Kalebic, N., Martinez, C., Perlas, E., Hublitz, P., Bilbao-Cortes, D., Fiedorczuk, K., Andolfo, A., a Heppenstall, P.A. (2013a). Tubulin acetyltransferase  $\alpha$ TAT1 destabilizes microtubules independently of its acetylation activity. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1114–1123.

Kalebic, N., Sorrentino, S., Perlas, E., Bolasco, G., Martinez, C., a Heppenstall, P.A. (2013b).  $\alpha$ TAT1 is the major  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase in mice. *Nat. Commun.* 4, 1–10.

Karpov, P.A., Sheremet, Y.A., Blume, Y.B., a Yemets, A.I. (2019). Studying the role of protein kinases CK1 in organization of cortical microtubules in *Arabidopsis thaliana* root cells. *Cytol. Genet.* 53, 441–450.

Kaul, N., Soppina, V., a Verhey, K.J. (2014). Effects of  $\alpha$ -tubulin K40 acetylation and detyrosination on kinesin-1 motility in a purified system. *Biophys. J.* 106, 2636–2643.

Kemphues, K.J., Raff, R.A., Kaufman, T.C., a Raff, E.C. (1979). Mutation in a structural gene for a  $\beta$ -tubulin specific to testis in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 3991–3995.

Kerr, G.P., a Carter, J. V. (1990a). Tubulin isotypes in rye roots are altered during cold acclimation. *Plant Physiol.* 93, 83–88.

Kerr, G.P., a Carter, J. V. (1990b). Relationship between freezing tolerance of root-tip cells and cold stability of microtubules in rye (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol.* 93, 77–82.

Kerr, J.P., Robison, P., Shi, G., Bogush, A.I., Kempema, A.M., Hexum, J.K., Becerra, N., Harki, D.A., Martin, S.S., Raiteri, R., et al. (2015). Detyrosinated microtubules modulate mechanotransduction in heart and skeletal muscle. *Nat. Commun.* 6, 1–14.

Kim, G.W., Li, L., Gorbani, M., You, L., a Yang, X.J. (2013). Mice lacking  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase 1 are viable but display  $\alpha$ -tubulin acetylation deficiency and dentate gyrus distortion. *J. Biol. Chem.* 288, 20334–20350.

Konno, A., Ikegami, K., Konishi, Y., Yang, H.J., Abe, M., Yamazaki, M., Sakimura, K., Yao, I., Shiba, K., Inaba, K., et al. (2016). *Ttl9*<sup>-/-</sup> mice sperm flagella show shortening of doublet 7, reduction of doublet 5 polyglutamylation and a stall in beating. *J. Cell Sci.* 129, 2757–2766.

- Kopczak, S.D., Haas, N.A., Hussey, P.J., Silflow, C.D., a Snustad, D.P. (1992). The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed  $\alpha$ -tubulin genes. *Plant Cell* 4, 539–547.
- Kovacs, J.J., Murphy, P.J.M., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C. V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B., a Yao, T.P. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol. Cell* 18, 601–607.
- Kozminski, K.G., Diener, D.R., a Rosenbaum, J.L. (1993). High level expression of nonacetylatable  $\alpha$ -tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 25, 158–170.
- Krauhs, E., Little, M., Kempf, T., Hofer-Warbinek, R., Ade, W., a Ponstingl, H. (1981). Complete amino acid sequence of  $\beta$ -tubulin from porcine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4156–4160.
- Kubo, T., Yanagisawa, H. aki, Yagi, T., Hirono, M., a Kamiya, R. (2010). Tubulin Polyglutamylation Regulates Axonemal Motility by Modulating Activities of Inner-Arm Dyneins. *Curr. Biol.* 20, 441–445.
- L'Hernault, S.W., a Rosenbaum, J.L. (1983). *Chlamydomonas*  $\alpha$ -tubulin is posttranslationally modified in the flagella during flagellar assembly. *J. Cell Biol.* 97, 258–263.
- Lacroix, B., van Dijk, J., Gold, N.D., Guizetti, J., Aldrian-Herrada, G., Rogowski, K., Gerlich, D.W., a Janke, C. (2010). Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J. Cell Biol.* 189, 945–954.
- Lalle, M., Camerini, S., Cecchetti, S., Fantauzzi, C.B., Crescenzi, M., a Pozio, E. (2011). *Giardia duodenalis* 14-3-3 protein is polyglycylated by a tubulin tyrosine ligase-like member and deglycylated by two metalloproteases. *J. Biol. Chem.* 286, 4471–4484.
- Lawrence, C.J., Morris, N.R., Meagher, R.B., a Dawe, R.K. (2001). Dyneins have run their course in plant lineage. *Traffic* 2, 362–363.
- Leandro-García, L.J., Leskelä, S., Landa, I., Montero-Conde, C., López-Jiménez, E., Letón, R., Cascón, A., Robledo, M., a Rodríguez-Antona, C. (2010). Tumoral and tissue-specific expression of the major human  $\beta$ -tubulin isoforms. *Cytoskeleton* 67, 214–223.
- Lehtreck, K.F., a Geimer, S. (2000). Distribution of polyglutamylated tubulin in the flagellar apparatus of green flagellates. *Cell Motil. Cytoskeleton* 47, 219–235.
- Ledbetter, M.C., a Porter, K.R. (1963). A „microtubule“ in plant cell fine structure. *J. Cell Biol.* 19, 239–250.
- LeDizet, M., a Piperno, G. (1986). Cytoplasmic microtubules containing acetylated  $\alpha$ -tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*: Spatial arrangement and properties. *J. Cell Biol.* 103, 13–22.
- Lee, Y.R.J., a Liu, B. (2019). Microtubule nucleation for the assembly of acentrosomal microtubule arrays in plant cells. *New Phytol.* 222, 1705–1718.
- Lee, A.H.Y., Hurley, B., Felsensteiner, C., Yea, C., Ckurshumova, W., Bartetzko, V., Wang, P.W., Quach, V., Lewis, J.D., Liu, Y.C., et al. (2012). A bacterial acetyltransferase destroys plant microtubule networks and blocks secretion. *PLoS Pathog.* 8.
- Lessard, D. V., Zinder, O.J., Hotta, T., Verhey, K.J., Ohi, R., a Berger, C.L. (2019). Polyglutamylation of tubulin's C-terminal tail controls pausing and motility of kinesin-3 family member KIF1A. *J. Biol. Chem.* 294, 6353–6363.
- Leu Wei-Ming, Cao Xiang-Ling, Wilson, T.J., Snustad, D.P., a Chua Nam-Hai (1995). Phytochrome A and phytochrome B mediate the hypocotyl-specific downregulation of TUB1 by light in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 7, 2187–2196.
- Lewis, S.A., a Cowan, N.J. (1988). Complex regulation and functional versatility of mammalian  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin isoforms during the differentiation of testis and muscle cells. *J. Cell Biol.* 106, 2023–2033.

- Lewis, S.A., Gu, W., a Cowan, N.J. (1987). Free intermingling of mammalian  $\beta$ -tubulin isotypes among functionally distinct microtubules. *Cell* 49, 539–548.
- Li, X.B., Cai, L., Cheng, N.H., a Liu, J.W. (2002). Molecular characterization of the cotton GhTUB1 gene that is preferentially expressed in fiber. *Plant Physiol.* 130, 666–674.
- Liu, N., Xiong, Y., Ren, Y., Zhang, L., He, X., Wang, X., Liu, M., Li, D., Shui, W., a Zhou, J. (2015). Proteomic profiling and functional characterization of multiple post-translational modifications of tubulin. *J. Proteome Res.* 14, 3292–3304.
- Livanos, P., a Müller, S. (2019). Division plane establishment and cytokinesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 70, 239–267.
- Ludueña, R.F. (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.* 178, 207–275.
- Ludueña, R.F. (2013). A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier Inc.), s. 41–185.
- Ly, N., Elkhatib, N., Bresteau, E., Piétrement, O., Khaled, M., Magiera, M.M., Janke, C., Le Cam, E., Rutenberg, A.D., a Montagnac, G. (2016).  $\alpha$ TAT1 controls longitudinal spreading of acetylation marks from open microtubules extremities. *Sci. Rep.* 6, 35624.
- Lytvyn, D.I., Olenieva, V.D., Yemets, A.I., a Blume, Y.B. (2018). Histochemical analysis of tissue-specific  $\alpha$ -tubulin acetylation as a response to autophagy induction by different stress factors in *Arabidopsis thaliana*. *Cytol. Genet.* 52, 245–252.
- Mages, W., Salbaum, J.M., Harper, J.F., a Schmitt, R. (1988). Organization and structure of *Volvox*  $\alpha$ -tubulin genes. *Mol. Gen. Genet. MGG* 213, 449–458.
- Mages, W., Cresnar, B., Harper, J.F., Brüderlein, M., a Schmitt, R. (1995). *Volvox carteri*  $\alpha$ 2- and  $\beta$ 2-tubulin-encoding genes: regulatory signals and transcription. *Gene* 160, 47–54.
- Maruta, H., Greer, K., a Rosenbaum, J.L. (1986). The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J. Cell Biol.* 103, 571–579.
- Mary, J., Redeker, V., Le Caer, J.P., Rossier, J., a Schmitter, J.M. (1996). Posttranslational modifications in the C-terminal tail of axonemal tubulin from sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.* 271, 9928–9933.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., et al. (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* 21, 6820–6831.
- Matthews, K.A., Rees, D., a Kaufman, T.C. (1993). A functionally specialized alpha-tubulin is required for oocyte meiosis and cleavage mitoses in *Drosophila*. *Development* 117, 977–991.
- McKenney, R.J., Huynh, W., Vale, R.D., a Sirajuddin, M. (2016). Tyrosination of  $\alpha$ -tubulin controls the initiation of processive dynein–dynactin motility. *EMBO J.* 35.
- Mendu, N., a Silflow, C.D. (1993). Elevated levels of tubulin transcripts accompany the GA3-induced elongation of oat internode segments. *Plant Cell Physiol.* 34, 973–983.
- Menéndez, M., Rivas, G., Díaz, J.F., a Andreu, J.M. (1998). Control of the structural stability of the tubulin dimer by one high affinity bound magnesium ion at nucleotide N-site. *J. Biol. Chem.* 273, 167–176.
- Mineyuki, Y., Wick, S.M., a Gunning, B.E.S. (1988). Preprophase bands of microtubules and the cell cycle: Kinetics and experimental uncoupling of their formation from the nuclear cycle in onion root-tip cells. *Planta* 174, 518–526.
- Mineyuki, Y., Murata, T., a Wada, M. (1991). Experimental obliteration of the preprophase band alters

the site of cell division, cell plate orientation and phragmoplast expansion in *Adiantum protonemata*. *J. Cell Sci.* 100, 551–557.

Mitchison, T., a Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–242.

Mittal, R., Peak-Chew, S.Y., Sade, R.S., Vallis, Y., a McMahon, H.T. (2010). The acetyltransferase activity of the bacterial toxin YopJ of *Yersinia* is activated by eukaryotic host cell inositol hexakisphosphate. *J. Biol. Chem.* 285, 19927–19934.

Miyake, Y., Keusch, J.J., Wang, L., Saito, M., Hess, D., Wang, X., Melancon, B.J., Helquist, P., Gut, H., a Matthias, P. (2016). Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition. *Nat. Chem. Biol.* 12, 748–754.

Montagnac, G., Meas-Yedid, V., Irondelle, M., Castro-Castro, A., Franco, M., Shida, T., Nachury, M. V., Benmerah, A., Olivo-Marin, J.C., a Chavrier, P. (2013).  $\alpha$ AT1 catalyses microtubule acetylation at clathrin-coated pits. *Nature* 502, 567–570.

Morejohn, L.C., a Fosket, D.E. (1986). Tubulins from plants, fungi, and protists. In *Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton*, (Boston, MA: Springer US), s. 257–329.

Morello, L., Braglia, L., Gavazzi, F., Giani, S., a Breviario, D. (2019). Tubulin-based DNA barcode: Principle and applications to complex food matrices. *Genes (Basel)*. 10.

Morley, S.J., Qi, Y., Iovino, L., Andolfi, L., Guo, D., Kalebic, N., Castaldi, L., Tischer, C., Portulano, C., Bolasco, G., et al. (2016). Acetylated tubulin is essential for touch sensation in mice. *Elife* 5, 25.

Mucha, J., Pawłowski, T.A., Klupezyńska, E.A., Guzik, M., a Zadworny, M. (2019). The effect of hydroxamic siderophores structure on acetylation of histone h3 and alpha tubulin in *pinus sylvestris* root cells. *Int. J. Mol. Sci.* 20.

Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T.I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., Horio, T., a Hasebe, M. (2005). Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of  $\gamma$ -tubulin in higher plants. *Nat. Cell Biol.* 7, 961–968.

Nakagawa, U., Suzuki, D., Ishikawa, M., Sato, H., Kamemura, K., a Imamura, A. (2013a). Acetylation of  $\alpha$ -tubulin on Lys 40 is a widespread post-translational modification in angiosperms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 1602–1605.

Nakagawa, U., Kamemura, K., a Imamura, A. (2013b). Regulated changes in the acetylation of  $\alpha$ -tubulin on Lys40 during growth and organ development in fast plants, *Brassica rapa* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 2228–2233.

Nick, P. (1998). Signaling to the microtubular cytoskeleton in plants. *Int. Rev. Cytol.* 184, 33–80.

Nieuwenhuis, J., Adamopoulos, A., Bleijerveld, O.B., Mazouzi, A., Stickel, E., Celie, P., Altelaar, M., Knipscheer, P., Perrakis, A., Blomen, V.A., et al. (2017). Vasohibins encode tubulin deacetylating activity. *Science* (80-. ). 358, 1453–1456.

Nogales, E., Wolf, S.G., a Downing, K.H. (1998). Structure of the  $\alpha\beta$  tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199–203.

Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A., a Downing, K.H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell* 96, 79–88.

North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M., a Verdin, E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol. Cell* 11, 437–444.

Oakley, R. V., Wang, Y.S., Ramakrishna, W., Harding, S.A., a Tsai, C.J. (2007). Differential expansion and expression of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin gene families in *Populus*. *Plant Physiol.* 145, 961–973.

- Olenieva, V., Lytvyn, D., Yemets, A., Bergounioux, C., a Blume, Y. (2019). Tubulin acetylation accompanies autophagy development induced by different abiotic stimuli in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Biol. Int.* *43*, 1056–1064.
- Orbach, R., a Howard, J. (2019). The dynamic and structural properties of axonemal tubulins support the high length stability of cilia. *Nat. Commun.* *10*, 1–11.
- Ori-McKenney, K.M., McKenney, R.J., Huang, H.H., Li, T., Meltzer, S., Jan, L.Y., Vale, R.D., Wiita, A.P., a Jan, Y.N. (2016). Phosphorylation of  $\beta$ -Tubulin by the Down Syndrome Kinase, Minibrain/DYRK1a, Regulates Microtubule Dynamics and Dendrite Morphogenesis. *Neuron* *90*, 551–563.
- Pamula, M.C., Ti, S.C., a Kapoor, T.M. (2016). The structured core of human  $\beta$  tubulin confers isotype-specific polymerization properties. *J. Cell Biol.* *213*, 425–433.
- Paredes, A.R., Somerville, C.R., a Ehrhardt, D.W. (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* (80- ). *312*, 1491–1495.
- Parrotta, L., Cai, G., a Cresti, M. (2010). Changes in the accumulation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin during bud development in *Vitis vinifera* L. *Planta* *231*, 277–291.
- Parrotta, L., Cresti, M., a Cai, G. (2014). Accumulation and post-translational modifications of plant tubulins. *Plant Biol.* *16*, 521–527.
- Pathak, N., Austin, C.A., a Drummond, I.A. (2011). Tubulin tyrosine ligase-like genes *ttl3* and *ttl6* maintain zebrafish cilia structure and motility. *J. Biol. Chem.* *286*, 11685–11695.
- Paturle-Lafanechère, L., Job, D., Eddé, B., Denoulet, P., Van Dorsselaer, A., Mazarguil, H., Le Caer, J.P., a Wehland, J. (1991). Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry* *30*, 10523–10528.
- Peris, L., Thery, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J.K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., et al. (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* *174*, 839–849.
- Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechère, L., Brocard, J., Moore, A.T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L., a Andrieux, A. (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J. Cell Biol.* *185*, 1159–1166.
- Pierson, E.S., a Cresti, M. (1992). Cytoskeleton and cytoplasmic organization of pollen and pollen tubes. *Int. Rev. Cytol.* *140*, 73–125.
- Piperno, G., a Fuller, M.T. (1985). Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of  $\alpha$ -tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *J. Cell Biol.* *101*, 2085–2094.
- Plett, K.L., Raposo, A.E., Bullivant, S., Anderson, I.C., Piller, S.C., a Plett, J.M. (2017). Root morphogenic pathways in *Eucalyptus grandis* are modified by the activity of protein arginine methyltransferases. *BMC Plant Biol.* *17*, 62.
- Portran, D., Schaedel, L., Xu, Z., Théry, M., a Nachury, M.V. (2017). Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat. Cell Biol.* *19*, 391–398.
- Prassanawar, S.S., a Panda, D. (2019). Tubulin heterogeneity regulates functions and dynamics of microtubules and plays a role in the development of drug resistance in cancer. *Biochem. J.* *476*, 1359–1376.
- Prota, A.E., Magiera, M.M., Kuijpers, M., Bargsten, K., Frey, D., Wieser, M., Jaussi, R., Hoogenraad, C.C., Kammerer, R.A., Janke, C., et al. (2013). Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *J. Cell Biol.* *200*, 259–270.
- Pugacheva, E.N., Jablonski, S.A., Hartman, T.R., Henske, E.P., a Golemis, E.A. (2007). HEF1-

Dependent Aurora A Activation Induces Disassembly of the Primary Cilium. *Cell* 129, 1351–1363.

Pydiura, N., Pirko, Y., Galinousky, D., Postovoitova, A., Yemets, A., Kilchevsky, A., a Blume, Y. (2019). Genome-wide identification, phylogenetic classification, and exon–intron structure characterization of the tubulin and actin genes in flax (*Linum usitatissimum*). *Cell Biol. Int.* 43, 1010–1019.

Radchuk, V. V. (2009). The transcriptome of the tubulin gene family in plants. In *The plant cytoskeleton: a key tool for agro-biotechnology*, Y.B. Blume, ed. (Springer, Dordrecht), s. 219–241.

Raff, E.C. (1984). Genetics of microtubule systems. *J. Cell Biol.* 99, 1–10.

Raff, E.C., Fackenthal, J.D., Hutchens, J.A., Hoyle, H.D., a Turner, F.R. (1997). Microtubule architecture specified by a  $\beta$ -tubulin isoform. *Science* (80-. ). 275, 70–73.

Rao, G., Zeng, Y., He, C., a Zhang, J. (2016). Characterization and putative post-translational regulation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin gene families in *Salix arbutifolia*. *Sci. Rep.* 6.

Redeker, V., Levilliers, N., Schmitter, J., Le Caer, J., Rossier, J., Adoutte, A., a Bre, M. (1994). Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science* (80-. ). 266, 1688–1691.

Redeker, V., Rossier, J., a Frankfurter, A. (1998). Posttranslational modifications of the C-terminus of  $\alpha$ -tubulin in adult rat brain:  $\alpha 4$  is glutamylated at two residues. *Biochemistry* 37, 14838–14844.

Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., a Verhey, K.J. (2006). Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Curr. Biol.* 16, 2166–2172.

Robison, P., Caporizzo, M.A., Ahmadzadeh, H., Bogush, A.I., Chen, C.Y., Margulies, K.B., Shenoy, V.B., a Prosser, B.L. (2016). Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes. *Science* (80-. ). 352, aaf0659–aaf0659.

Rocha, C., Papon, L., Cacheux, W., Marques Sousa, P., Lascano, V., Tort, O., Giordano, T., Vacher, S., Lemmers, B., Mariani, P., et al. (2014). Tubulin glycylation is required for primary cilia, control of cell proliferation and tumor development in colon. *EMBO J.* 33, 2247–2260.

Rogowski, K., Juge, F., van Dijk, J., Wloga, D., Strub, J.M., Levilliers, N., Thomas, D., Bré, M.H., Van Dorsselaer, A., Gaertig, J., et al. (2009). Evolutionary Divergence of Enzymatic Mechanisms for Posttranslational Polyglycylation. *Cell* 137, 1076–1087.

Rogowski, K., van Dijk, J., Magiera, M.M., Bosc, C., Deloulme, J.C., Bosson, A., Peris, L., Gold, N.D., Lacroix, B., Grau, M.B., et al. (2010). A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* 143, 564–578.

Roll-Mecak, A. (2015). Intrinsically disordered tubulin tails: Complex tuners of microtubule functions? *Semin. Cell Dev. Biol.* 37, 11–19.

Roll-Mecak, A. (2019). How cells exploit tubulin diversity to build functional cellular microtubule mosaics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 56, 102–108.

Sabo, Y., Walsh, D., Barry, D.S., Tinaztepe, S., De Los Santos, K., Goff, S.P., Gundersen, G.G., a Naghavi, M.H. (2013). HIV-1 induces the formation of stable microtubules to enhance early infection. *Cell Host Microbe* 14, 535–546.

Schaefer, E., Belcram, K., Uyttewaal, M., Duroc, Y., Goussot, M., Legland, D., Laruelle, E., De Tauzia-Moreau, M.L., Pastuglia, M., a Bouchez, D. (2017). The preprophase band of microtubules controls the robustness of division orientation in plants. *Science* (80-. ). 356, 186–189.

Schneider, A., Plessmann, U., Felleisen, R., a Weber, K. (1998). Posttranslational modifications of trichomonad tubulins; identification of multiple glutamylation sites. *FEBS Lett.* 429, 399–402.

- Schneider, N., Ludwig, H., a Nick, P. (2015). Suppression of tubulin detyrosination by parthenolide recruits the plant-specific kinesin KCH to cortical microtubules. *J. Exp. Bot.* *66*, 2001–2011.
- Schröder, J., Stenger, H., a Wernicke, W. (2001).  $\alpha$ -Tubulin genes are differentially expressed during leaf cell development in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol. Biol.* *45*, 723–730.
- Schwer, H.D., Lecine, P., Tiwari, S., Italiano, J.E., Hartwig, J.H., a Shivdasani, R.A. (2001). A lineage-restricted and divergent  $\beta$ -tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr. Biol.* *11*, 579–586.
- Sgrò, F., Bianchi, F.T., Falcone, M., Pallavicini, G., Gai, M., Chiotto, A.M.A., Berto, G.E., Turco, E., Chang, Y.J., Huttner, W.B., et al. (2016). Tissue-specific control of midbody microtubule stability by Citron kinase through modulation of TUBB3 phosphorylation. *Cell Death Differ.* *23*, 801–813.
- Shida, T., Cueva, J.G., Xu, Z., Goodman, M.B., a Nachury, M. V. (2010). The major  $\alpha$ -tubulin K40 acetyltransferase  $\alpha$ TAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 21517–21522.
- Shin, S.C., Im, S.K., Jang, E.H., Jin, K.S., Hur, E.M., a Kim, E.E.K. (2019). Structural and molecular basis for katanin-mediated severing of glutamylated microtubules. *Cell Rep.* *26*, 1357-1367.e5.
- Silflow, C.D., Chisholm, R.L., Conner, T.W., a Ranum, L.P. (1985). The two alpha-tubulin genes of *Chlamydomonas reinhardtii* code for slightly different proteins. *Mol. Cell. Biol.* *5*, 2389–2398.
- Silflow, C.D., Oppenheimer, D.G., Kopczak, S.D., Ploense, S.E., Ludwig, S.R., Haas, N., a Peter Snustad, D. (1987). Plant tubulin genes: Structure and differential expression during development. *Dev. Genet.* *8*, 435–460.
- Silva, M., Morsci, N., Nguyen, K.C.Q., Rizvi, A., Rongo, C., Hall, D.H., a Barr, M.M. (2017). Cell-specific  $\alpha$ -tubulin isotype regulates ciliary microtubule ultrastructure, intraflagellar transport, and extracellular vesicle biology. *Curr. Biol.* *27*, 968–980.
- Sirajuddin, M., Rice, L.M., a Vale, R.D. (2014). Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat. Cell Biol.* *16*, 335–344.
- Skoufias, D.A., a Wilson, L. (1998). Assembly and colchicine binding characteristics of tubulin with maximally tyrosinated and detyrosinated  $\alpha$ -tubulins. *Arch. Biochem. Biophys.* *351*, 115–122.
- Skultetyova, L., Ustinova, K., Kutil, Z., Novakova, Z., Pavlicek, J., Mikesova, J., Trapl, D., Baranova, P., Havlinova, B., Hubalek, M., et al. (2017). Human histone deacetylase 6 shows strong preference for tubulin dimers over assembled microtubules. *Sci. Rep.* *7*.
- Smertenko, A., Blume, Y., Viklický, V., Opatrný, Z., a Dráber, P. (1997). Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in *Nicotiana tabacum* L. cells. *Planta* *201*, 349–358.
- Smirnova, E.A., a Bajer, A.S. (1992). Spindle poles in higher plant mitosis. *Cell Motil. Cytoskeleton* *23*, 1–7.
- Snustad, D.P., Haas, N.A., Kopczak, S.D., a Silflow, C.D. (1992). The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed  $\beta$ -tubulin genes. *Plant Cell* *4*, 549–556.
- Spokevicius, A. V., Southerton, S.G., MacMillan, C.P., Qiu, D., Gan, S., Tibbits, J.F.G., Moran, G.F., a Bossinger, G. (2007).  $\beta$ -tubulin affects cellulose microfibril orientation in plant secondary fibre cell walls. *Plant J.* *51*, 717–726.
- Sudo, H., a Baas, P.W. (2010). Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *J. Neurosci.* *30*, 7215–7226.
- Sullivan, K.F. (1988). Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu. Rev. Cell Biol.* *4*, 687–716.
- Suryavanshi, S., Eddé, B., Fox, L.A., Guerrero, S., Hard, R., Hennessey, T., Kabi, A., Malison, D.,



- Pennock, D., Sale, W.S., et al. (2010). Tubulin glutamylation regulates ciliary motility by altering inner dynein arm activity. *Curr. Biol.* 20, 435–440.
- Takatani, S., Ozawa, S., Yagi, N., Hotta, T., Hashimoto, T., Takahashi, Y., Takahashi, T., a Motose, H. (2017). Directional cell expansion requires NIMA-related kinase 6 (NEK6)-mediated cortical microtubule destabilization. *Sci. Rep.* 7.
- Ti, S.C., Alushin, G.M., a Kapoor, T.M. (2018). Human  $\beta$ -tubulin isoforms can regulate microtubule protofilament number and stability. *Dev. Cell* 47.
- Tilney, L.G., Bryan, J., Bush, D.J., Fujiwara, K., Mooseker, M.S., Murphy, D.B., a Snyder, D.H. (1973). Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J. Cell Biol.* 59, 267–275.
- Topalidou, I., Keller, C., Kalebic, N., Nguyen, K.C.Q., Somhegyi, H., Politi, K.A., Heppenstall, P., Hall, D.H., a Chalfie, M. (2012). Genetically separable functions of the MEC-17 tubulin acetyltransferase affect microtubule organization. *Curr. Biol.* 22, 1057–1065.
- Tort, O., Tanco, S., Rocha, C., Bièche, I., Seixas, C., Bosc, C., Andrieux, A., Moutin, M.J., Avilés, F.X., Lorenzo, J., et al. (2014). The cytosolic carboxypeptidases CCP2 and CCP3 catalyze posttranslational removal of acidic amino acids. *Mol. Biol. Cell* 25, 3017–3027.
- Tran, H.T., Nimick, M., Uhrig, R.G., Templeton, G., Morrice, N., Gourlay, R., Delong, A., a Moorhead, G.B.G. (2012). *Arabidopsis thaliana* histone deacetylase 14 (HDA14) is an  $\alpha$ -tubulin deacetylase that associates with PP2A and enriches in the microtubule fraction with the putative histone acetyltransferase ELP3. *Plant J.* 71, 263–272.
- Unger, E., Böhm, K.J., a Vater, W. (1990). Structural diversity and dynamics of microtubules and polymorphic tubulin assemblies. *Electron Microsc. Rev.* 3, 355–395.
- Valenstein, M.L., a Roll-Mecak, A. (2016). Graded control of microtubule severing by tubulin glutamylation. *Cell* 164, 911–921.
- Vemu, A., Atherton, J., Spector, J.O., Moores, C.A., a Roll-Mecak, A. (2017). Tubulin isoform composition tunes microtubule dynamics. *Mol. Biol. Cell* 28, 3564–3572.
- Villemur, R., Joyce, C.M., Haas, N.A., Goddard, R.H., Kopczak, S.D., Hussey, P.J., Snustad, D.P., a Silflow, C.D. (1992).  $\alpha$ -Tubulin gene family of maize (*Zea mays* L.). Evidence for two ancient  $\alpha$ -tubulin genes in plants. *J. Mol. Biol.* 227, 81–96.
- Vinh, J., Langridge, J.I., Bré, M.H., Levilliers, N., Redeker, V., Loyaux, D., a Rossier, J. (1999). Structural characterization by tandem mass spectrometry of the posttranslational polyglycylation of tubulin. *Biochemistry* 38, 3133–3139.
- Wall, K.P., Pagratis, M., Armstrong, G., Balsbaugh, J.L., Verbeke, E., Pearson, C.G., a Hough, L.E. (2016). Molecular determinants of tubulin's C-terminal tail conformational ensemble. *ACS Chem. Biol.*
- Wang, B., Rao, Y.H., Inoue, M., Hao, R., Lai, C.H., Chen, D., McDonald, S.L., Choi, M.C., Wang, Q., Shinohara, M.L., et al. (2014). Microtubule acetylation amplifies p38 kinase signalling and anti-inflammatory IL-10 production. *Nat. Commun.* 5.
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M., Sensi, E., a Cresti, M. (2004). Post-translational modifications of  $\alpha$ -tubulin in *Zea mays* L. are highly tissue specific. *Planta* 218, 460–465.
- Wasteneys, G.O. (2002). Microtubule organization in the green kingdom: Chaos or self-order? *J. Cell Sci.* 115, 1345–1354.
- Webster, D.R., Gundersen, G.G., Bulinski, J.C., a Borisy, G.G. (1987). Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 9040–9044.
- Whittaker, D.J., a Triplett, B.A. (1999). Gene-specific changes in  $\alpha$ -tubulin transcript accumulation in developing cotton fibers. *Plant Physiol.* 121, 181–188.

- Wick, S.M. (1985). Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells. III. Transition between mitotic/ cytokinetic and interphase microtubule arrays. *Cell Biol. Int. Rep.* 9, 357–371.
- Wiesler, B., Wang, Q.Y., a Nick, P. (2002). The stability of cortical microtubules depends on their orientation. *Plant J.* 32, 1023–1032.
- Wloga, D., Rogowski, K., Sharma, N., Van Dijk, J., Janke, C., Eddé, B., Bré, M.H., Levilliers, N., Redeker, V., Duan, J., et al. (2008). Glutamylation on  $\alpha$ -tubulin is not essential but affects the assembly and functions of a subset of microtubules in *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryot. Cell* 7, 1362–1372.
- Wloga, D., Webster, D.M., Rogowski, K., Bré, M.H., Levilliers, N., Jerka-Dziadosz, M., Janke, C., Dougan, S.T., a Gaertig, J. (2009). TTLL3 is a tubulin glycine ligase that regulates the assembly of cilia. *Dev. Cell* 16, 867–876.
- Wolff, A., De Nechaud, B., Chillet, D., Mazarguil, H., Desbruyeres, E., Audebert, S., Edde, B., Gros, F., a Denoulet, P. (1992). Distribution of glutamylated  $\alpha$  and  $\beta$ -tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. *Eur. J. Cell Biol.* 59, 425–432.
- Xia, P., Ye, B., Wang, S., Zhu, X., Du, Y., Xiong, Z., Tian, Y., a Fan, Z. (2016). Glutamylation of the DNA sensor cGAS regulates its binding and synthase activity in antiviral immunity. *Nat. Immunol.* 17, 369–378.
- Xie, R., Nguyen, S., McKeehan, W.L., a Liu, L. (2010). Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes. *BMC Cell Biol.* 11.
- Xiong, X., Xu, D., Yang, Z., Huang, H., a Cui, X. (2013). A single amino-acid substitution at lysine 40 of an arabidopsis thaliana  $\alpha$ -tubulin causes extensive cell proliferation and expansion defects. *J. Integr. Plant Biol.* 55, 209–220.
- Xiong, Z., Xia, P., Zhu, X., Geng, J., Wang, S., Ye, B., Qin, X., Qu, Y., He, L., Fan, D., et al. (2020). Glutamylation of deubiquitinase BAP1 controls self-renewal of hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *J. Exp. Med.* 217.
- Xu, Z., Schaedel, L., Portran, D., Aguilar, A., Gaillard, J., Peter Marinkovich, M., Théry, M., a Nachury, M. V. (2017). Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation. *Science.* 356, 328–332.
- Yan, C., Wang, F., Peng, Y., Williams, C.R., Jenkins, B., Wildonger, J., Kim, H.J., Perr, J.B., Vaughan, J.C., Kern, M.E., et al. (2018). Microtubule acetylation is required for mechanosensation in *Drosophila*. *Cell Rep.* 25, 1051–1065.e6.
- Yang, G., Jan, A., a Komatsu, S. (2007). Functional analysis of OstTUB8, an anther-specific  $\beta$ -tubulin in rice. *Plant Sci.* 172, 832–838.
- Yang, H., Ganguly, A., Yin, S., a Cabral, F. (2011). Megakaryocyte lineage-specific class VI  $\beta$ -tubulin suppresses microtubule dynamics, fragments microtubules, and blocks cell division. *Cytoskeleton* 68, 175–187.
- Ye, B., Li, C., Yang, Z., Wang, Y., Hao, J., Wang, L., Li, Y., Du, Y., Hao, L., Liu, B., et al. (2014). Cytosolic carboxypeptidase CCP6 is required for megakaryopoiesis by modulating Mad2 polyglutamylation. *J. Exp. Med.* 211, 2439–2454.
- Yemets, A., Sheremet, Y., Vissenberg, K., Van Orden, J., Verbelen, J.P., a Blume, Y.B. (2008). Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells. *Cell Biol. Int.* 32, 630–637.
- Yoshikawa, M., Yang, G., Kawaguchi, K., a Komatsu, S. (2003). Expression analyses of  $\beta$ -tubulin isotype genes in rice. *Plant Cell Physiol.* 44, 1202–1207.
- Yoshimura, T., Demura, T., Igarashi, M., a Fukuda, H. (1996). Differential expression of three genes

for different  $\beta$ -tubulin isotypes during the initial culture of *Zinnia mesophyll* cells that divide and differentiate into tracheary elements. *Plant Cell Physiol.* 37, 1167–1176.

Youngblom, J., Schloss, J.A., a Silflow, C.D. (1984). The two beta-tubulin genes of *Chlamydomonas reinhardtii* code for identical proteins. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2686–2696.

Yu, I., Garnham, C.P., a Roll-Mecak, A. (2015). Writing and reading the tubulin code. *J. Biol. Chem.* 290, 17163–17172.

Yu, Y., Li, Y., Li, L., Lin, J., Zheng, C., a Zhang, L. (2009). Overexpression of PwTUA1, a pollen-specific tubulin gene, increases pollen tube elongation by altering the distribution of  $\alpha$ -tubulin and promoting vesicle transport. *J. Exp. Bot.* 60, 2737–2749.

Zachariadis, M., Quader, H., Galatis, B., a Apostolakis, P. (2001). Endoplasmic reticulum preprophase band in dividing root-tip cells of *Pinus brutia*. *Planta* 213, 824–827.

Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J.T., Yang, X.J., Dent, S.R., et al. (2007). HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol. Cell* 27, 197–213.

Zilberman, Y., Ballestrem, C., Carramusa, L., Mazitschek, R., Khochbin, S., a Bershadsky, A. (2009). Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *J. Cell Sci.* 122, 3531–3541.

Tubulins | HUGO Gene Nomenclature Committee.